

**Liganden- und Struktur-basiertes Design und Entwicklung
potentieller eIF4A-Inhibitoren**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Thi Lan Phuong Pham, M. Sc.

aus Salzgitter

Marburg/Lahn, 2021

Erstgutachter:	Prof. Dr. Martin Schlitzer
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Arnold Grünweller
eingereicht am:	05.10.2021
Tag der mündlichen Prüfung:	16.11.2021
Hochschulziffer:	1180

Band 1
Theoretischer Teil

Danksagung

Aus Gründen des Persönlichkeitsschutzes wird von der elektronischen Veröffentlichung der Danksagung abgesehen.

Veröffentlichungen

Die hier gezeigten wissenschaftlichen Beiträge sind aus vorliegender Arbeit hervorgegangen.

Vorträge

„Synthesis and Biological Evaluation of Sulfonamides as Potential eIF4A Inhibitor“ (1st Retreat of DRUID, Rauschholzhausen, 27.11.2018)

„Structure-based Design of Potential eIF4A Inhibitors“ (2nd Retreat of DRUID, Rauschholzhausen, 25.11-26.11.2019)

„Targeting eIF4A with various Structure-based Approaches“ (3rd Retreat of DRUID, Rauschholzhausen, 26.10-27.10.2020)

Poster

„Chemistry Against Infectious Diseases - Sulfonamides“ (Frühjahrssymposium 2019)

Abstract

Ligand- and Structure-based Design and Development of Potential eIF4A Inhibitors

Since the beginning of the 21st century, there have been repeated large outbreaks caused by RNA viruses (EBOV, SARS-CoV-1, MERS-CoV, SARS-CoV-2, Zika virus). The Ebola epidemic in West Africa in 2014 and the ongoing COVID-19 pandemic (coronavirus disease 2019) represent a global threat to humanity and highlight the need for antiviral drugs to combat the current and future pandemics. Due to the high mutation rate of RNA viruses, the risk of developing resistance through new variants is always present, since RNA viruses can quickly adapt to new conditions. In this case, the inhibition of virus-specific proteins could lead to a loss of the efficacy of antiviral drugs. Addressing host factors with antiviral drugs, on the other hand, could minimize the risk of this resistance development. One promising target is the DEAD-box helicase eIF4A which is used by different RNA viruses for the translation of their viral proteins. As a natural eIF4A inhibitor, Silvestrol in particular is a very interesting target because it inhibits a broad spectrum of RNA viruses in a nanomolar range. Considering its potential as antiviral drug, it could also be used to treat new emerging viruses. An disadvantage is its complex structure and the resulting difficult synthesis. Therefore, this thesis focuses on the development of small molecules that have a similar structure and inhibition as Silvestrol, but are more drug-like.

The main focus of this thesis was the synthesis of novel eIF4A-inhibitors by using a ligand- and structure-based design with spotlight on two substance classes, sulfonamides and *N*-acylamino acid amides. From repetitive cycles of synthesis, testing and optimization through modifications of different components of the starting structures, important findings for the further development of the structures were drawn. The linear sulfonamides, based on a previous work, were optimized with the inclusion of molecular docking to obtain branched sulfonamides. Thereby, the unspecific inhibitory effect of the linear sulfonamides could be improved to a specific inhibitory effect. Compounds with a specific inhibitory effect on the translation were also identified among the *N*-acylamino acid amides resulting from a rational design. Two promising compounds derived from these two substance classes even showed an antiviral effect

against the coronaviruses HCoV-229E and SARS-CoV-2, while another compound showed activity against the Rift Valley Fever Virus. Finally, the basis for future work in the field of *N*-acylamino acid amides and branched sulfonamides could be laid in the present dissertation.

Zusammenfassung

Seit Beginn des 21. Jahrhunderts kam es bereits wiederholt zu großen Ausbrüchen, die durch RNA-Viren (EBOV, SARS-CoV-1, MERS-CoV, SARS-CoV-2, Zika-Virus) ausgelöst wurden. So stellte die Ebola Epidemie 2014 in Westafrika und die aktuelle COVID-19-Pandemie (*coronavirus disease 2019*) eine globale Bedrohung für die Menschheit dar und verdeutlicht die Notwendigkeit antiviraler Wirkstoffe zur Bekämpfung der jetzigen und zukünftiger Pandemien. Durch die hohe Mutationsrate der RNA-Viren besteht jedoch immer die Gefahr einer Resistenzentwicklung durch neue Varianten, da die RNA-Viren sich schnell an neue Bedingungen anpassen können. Eine Hemmung virusspezifischer Proteine könnte in diesem Fall zu einem Verlust der Wirksamkeit des antiviralen Wirkstoffs führen. Das Adressieren der körpereigenen Faktoren durch antivirale Wirkstoffe hingegen würde der Gefahr einer Resistenzentwicklung entgegenwirken. Ein vielversprechendes Zielmolekül ist die DEAD-Box Helikase eIF4A, die von verschiedenen RNA-Viren zur Translation ihrer viralen Proteine genutzt wird. In Anbetracht dessen ist Silvestrol, ein natürlich vorkommender eIF4A-Inhibitor, sehr interessant, da es ein breites Spektrum von RNA-Viren im nanomolaren Bereich hemmt. Als potentieller antiviraler Wirkstoff birgt es somit viel Potential, da es auch zur Behandlung von neu auftretenden Viren eingesetzt werden könnte. Nachteilig ist nur seine komplexe Struktur und die damit einhergehende schwierige Synthese. Im Rahmen dieser Arbeit wurde folglich alternativ nach kleinen Molekülen gesucht, die eine ähnliche Struktur und Hemmung wie Silvestrol aufwiesen, jedoch Wirkstoff ähnlicher sind.

Schwerpunkt dieser Arbeit war die Synthese neuartiger eIF4A-Inhibitoren mittels eines Ligan- und Struktur-basierten Designs. Aus sich wiederholenden Zyklen aus Synthese, Testung und Optimierung durch Modifikationen der unterschiedlichen Komponenten der Ausgangsstrukturen wurden wichtige Erkenntnisse zur Weiterentwicklung der Strukturen gezogen. Der Fokus lag auf zwei Stoffklassen, den Sulfonamiden und *N*-Acylaminosäureamiden. Die linearen Sulfonamide beruhten auf einer vorangegangenen Arbeit und wurden im Verlauf der Promotion unter Einbeziehung von molekularem Docking zu der Stoffklasse der verzweigten Sulfonamide weiterentwickelt. Die unspezifische Hemmwirkung der linearen Sulfonamide wurde

im Zuge dessen auf eine spezifische Hemmwirkung verbessert. Unter den aus dem rationalen Design entstandenen *N*-Acylaminosäureamiden wurden ebenfalls Verbindungen mit einer spezifischen Hemmung der Translation identifiziert. Zwei vielversprechende Verbindungen aus den beiden Stoffklassen wiesen einen antiviralen Effekt gegen die Coronaviren HCoV-229E und SARS-CoV-2 auf, während eine weitere Verbindung eine Aktivität gegen das *Rift-Valley-Fever-Virus* zeigte. Abschließend konnte in der vorliegenden Dissertation die Grundlage für zukünftige Arbeiten auf dem Gebiet der *N*-Acylaminosäureamide und der verzweigten Sulfonamide gelegt werden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ebolavirus	2
1.1.1	Ursprung und Arten	2
1.1.2	Aufbau und Struktur	2
1.1.3	Replikation und Lebenszyklus	4
1.1.4	Immunantwort	6
1.2	Ebolavirus Erkrankung	6
1.2.1	Übertragungswege	6
1.2.2	Symptome	7
1.2.3	Diagnose und Behandlung	8
1.2.4	Ebola Virus Ausbrüche	9
1.3	Ansatzpunkte zur Entwicklung von Wirkstoffen gegen das Ebolavirus	11
1.3.1	Antikörper	11
1.3.2	Small interfering RNA (siRNA)	11
1.3.3	Nukleos(t)id-Analoga	12
1.4	Remdesivir: Von Ebola zu SARS-CoV-2	13
1.5	Coronavirus	15
1.5.1	Ursprung und Arten	15
1.5.2	Aufbau und Struktur	15
1.5.3	Replikation und Lebenszyklus	17
1.5.4	Immunantwort	18
1.6	Coronavirus Disease (COVID19)	20
1.6.1	Übertragungswege	20
1.6.2	Symptome	21
1.6.3	Diagnose und Behandlung	22
1.6.4	Coronavirus Ausbrüche	23
1.7	Ansatzpunkte zur Entwicklung von Wirkstoffen gegen den Coronavirus	26

1.8	Humane Helikase als Target in der antiviralen Wirkstoffentwicklung	31
1.8.1	<i>Small molecules</i> als eIF4A-Inhibitoren	33
2	Aufgabenstellung und Motivation	35
3	Ergebnisse und Diskussion	38
3.1	Liganden-basiertes Design	38
3.2	Biologische Testungen neuer potentieller eIF4A-Inhibitoren	39
3.3	Lineare Sulfonamide	41
3.3.1	Motivation und Idee	41
3.3.2	Synthese und biologische Testungen der linearen Sulfonamide	43
3.3.3	Modifikation des Strukturelements III	43
3.3.4	Modifikation der funktionellen Gruppen	48
3.3.5	Synthese der Sulfonylbenzamid-Derivate	50
3.3.6	Modifikation des Strukturelements I	53
3.3.7	Variation des Abstands im Strukturelement I	57
3.3.8	Modifikationen der Strukturelemente I und III	60
3.3.9	Zusammenfassung der Ergebnisse der linearen Sulfonamide	61
3.4	Propellerartige Sulfonamide	62
3.4.1	Motivation und Idee	62
3.4.2	Optimierung der Synthese der sekundären Amine	63
3.4.3	Synthese der propellerartigen Sulfonamide	66
3.4.4	Biologische Ergebnisse der propellerartigen Sulfonamide	69
3.5	Propellerartige Carbonsäureamide	71
3.5.1	Motivation und Idee	71
3.5.2	Synthese der propellerartigen Carbonsäureamide	71
3.5.3	Biologische Ergebnisse der propellerartigen Carbonsäureamide	73
3.6	DIELS-ALDER-Addukte	74
3.6.1	Motivation und Idee	74
3.6.2	Synthese der DIELS-ALDER-Addukte	74

3.6.3	Biologische Ergebnisse der DIELS-ALDER-Addukte	75
3.7	Rhodanine	76
3.7.1	Allolaurinterol-Projekt	76
3.7.2	Synthese der Rhodanine	77
3.7.3	Biologische Ergebnisse der Rhodanine	79
3.8	Struktur-basiertes Design	80
3.8.1	Kristallstruktur der humanen RNA-Helikase eIF4A	80
3.8.2	Molekulares Docking von Silvestrol	82
3.8.3	<i>in silico</i> Docking	83
3.9	<i>N</i> -Acylaminosäureamide	85
3.9.1	Idee und Entwicklung der <i>N</i> -Acylaminosäureamide	85
3.9.2	Synthese der <i>N</i> -Acylaminosäureamide	89
3.10	Derivate nicht-proteinogener Aminosäuren	118
3.10.1	Synthese der nicht-proteinogenen Aminosäuren	118
3.10.2	Biologische Ergebnisse der Derivate nicht-proteinogenen Aminosäuren	122
3.10.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der <i>N</i> -Acylaminosäureamide . . .	123
3.11	Verzweigung der linearen Sulfonamide	125
3.11.1	Idee und Entwicklung der verzweigten Sulfonamide	125
3.11.2	Synthese der verzweigten Sulfonamide	130
3.11.3	Biologische Ergebnisse der verzweigten Sulfonamide	132
3.12	Biologische Testungen gegen adulte Wurmpaare der Spezies <i>Schistosoma man-soni</i>	135
3.13	Biologische Testung der linearen Sulfonamide gegen das Rift-Valley-Fever-Virus (RVFV)	144
3.14	Biologische Testungen gegen Coronaviren	147
3.15	Biologische Testungen mittels Thermal-Shift-Assay (TSA)	152
4	Zusammenfassung und Ausblick	157
5	Literaturverzeichnis	171

6	Lebenslauf	177
7	Eidesstattliche Erklärung	180
8	Anhang	182
8.1	Zusammenfassung der Ergebnisse aller im TSA getesteten Verbindungen . .	182
8.2	Zusammenfassung der Ergebnisse aller im WST getesteten Verbindungen . .	183
8.3	Erläuterungen zu den Angaben im Anhang zu den biologischen Testergebnissen gegen <i>Schistosoma mansoni</i>	203

Abbildungsverzeichnis

1	Graphische Darstellung des Coronavirus und Ebolavirus (PDB:5Z9W).	1
2	Genomische Struktur des Ebolavirus.	2
3	Virion des Ebolavirus.	3
4	Aufbau des Ebolavirus.	3
5	Replikationszyklus des Ebolavirus.	5
6	Ebola Epidemie 2014-2016: Ausbreitung in der Welt mit Fallzahlen.	10
7	Strukturen von Galidesivir, Remdesivir und Favipiravir.	12
8	Schematische Darstellung des SARS-CoV-2 Virus.	16
9	Schematische Darstellung des SARS-CoV-2 Genoms.	16
10	Schematische Darstellung der Replikation des SARS-CoV-2 Virus.	19
11	Vergleich einer gesunden Lunge und eines gesunden Gehirns mit denen eines Patienten mit einer SARS-CoV-2 Infektion.	21
12	Pandemie durch SARS-CoV-2: Weltkarte mit Fallzahlen von der WHO (Stand: 01.10.2021).	24
13	Vergleich der traditionellen und beschleunigten Impfstoffentwicklung.	26
14	Verschiedene Therapieansätze zur Prophylaxe einer SARS-CoV-2 Erkrankung.	28
15	Strukturen potentieller antiviraler Wirkstoffe gegen SARS-CoV-2.	29
16	Vereinfachte Darstellung der eukaryotischen Translationsinitiation.	31
17	Bekannte eIF4A-Inhibitoren.	33
18	Struktur von Silvestrol und dem linearen Sulfonamid Schl-35-061	35
19	Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten Stoffklassen.	36
20	Ausgangspunkt der Dissertation mit einem Liganden-basierten Ansatz aus der Masterarbeit von P. MENZEL.	38
21	Schematische Darstellung der möglichen Ergebnisse eines DLA.	40
22	Erste SAR der linearen Sulfonamide.	41
23	Alle in dieser Arbeit durchgeführten Modifikationen an der Stoffklasse der linearen Sulfonamide.	42

24	Dargestellte lineare Sulfonamide mit Modifikationen des Strukturelements III und ihre Ausbeuten.	44
25	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz von PIM1 und β -Globin normalisiert auf DMSO ist für das Chlor-Derivat Schl-38-001 und Methyl-Derivat Schl-38-002 zusammengefasst.	46
26	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene lineare Sulfonamide mit Modifikationen im Molekülteil C zusammengefasst.	47
27	Dargestellte lineare Sulfonamide mit Modifikationen der funktionellen Gruppen und ihre Ausbeuten.	48
28	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz von PIM1 und β -Globin normalisiert auf DMSO ist für die Ausgangsverbindung Schl-35-061 und Schl-38-003 , mit zwei Carbonsäureamid-Strukturen, zusammengefasst.	51
29	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene lineare Sulfonamide mit Modifikationen der funktionellen Gruppen zusammengefasst.	52
30	Dargestellte lineare Sulfonamide mit Modifikationen des Strukturelements I und ihre Ausbeuten.	53
31	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene lineare Sulfonamide mit EWGs im Strukturelement I zusammengefasst.	55
32	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene lineare Sulfonamide mit EDGs im Molekülteil A zusammengefasst.	56
33	Dargestellte lineare Sulfonamide mit Modifikationen des <i>N</i> -Aryl-Sulfonamids und ihre Ausbeuten.	58

34	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene lineare Sulfonamide mit Modifikationen des <i>N</i> -Aryl-Sulfonamids zusammengefasst.	59
35	Dargestelltes lineares Sulfonamid mit Modifikationen der Strukturelemente I und III. Es wurde kein DLA durchgeführt, da die Verbindung im WST-1-Assay keine Zytotoxizität bei Konzentrationen von 10 μ M und 100 μ M zeigte.	60
36	Übersicht der Verbindungen aus der Stoffklasse der <i>N</i> -Acylaminosäureamide mit einem spezifischen Hemmeffekt auf die Translation.	61
37	Modifikationen an der Struktur der propellerartigen Sulfonamide.	62
38	Dargestellte propellerartigen Sulfonamide und ihre Ausbeuten.	68
39	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene propellerartige Sulfonamide zusammengefasst.	69
40	Modifikationen an der Struktur der propellerartigen Carbonsäureamide.	71
41	Dargestellte propellerartige Carbonsäureamide und ihre Ausbeuten.	72
42	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene propellerartige Carbonsäureamide zusammengefasst.	73
43	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen der DIELS-ALDER-Addukte bei einer Konzentration von 10 μ M.	75
44	Bekannte Naturstoffe, die als eIF4A-Inhibitoren wirken. ^[52] In türkis sind die Struktur motive markiert, die bei allen Verbindungen ähnlich sind.	76
45	Dargestellte Rhodanine und ihre Ausbeuten.	78
46	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene Rhodanine zusammengefasst.	79
47	(1) Kristallstruktur der humanen DEAD-Box Helikase eIF4A (grau) mit einer Polypurin-RNA (grün) (PDB: 5ZC9). (2) Vergrößert abgebildet ist die Binde tasche mit einer schematischen Darstellung der Subtaschen A (grün), B (blau) und C (rot).	81

48	Kristallstruktur der humanen RNA-Helikase (PDB:5ZC9) mit RocA in der Bindetasche und allen wichtigen Wechselwirkungen.	82
49	Dockingpose von Silvestrol in der Kristallstruktur der humanen Helikase. . .	83
50	Struktur-basiertes Design der <i>N</i> -Acylaminosäureamide: Entwurf passender Struktur motive für die Subtaschen A, B und C schematisch dargestellt.	85
51	Exemplarische Dockingposen der drei Grundstrukturen in der Kristallstruktur des Helikase-Komplexes (PDB:5ZC9).	87
52	Alle in dieser Arbeit durchgeführten Modifikationen an der Stoffklasse der <i>N</i> -Acylaminosäureamide.	88
53	Dargestellte <i>N</i> -Acylaminosäureamide mit Modifikationen des Molekülteil A und ihre Ausbeuten.	90
54	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist Derivate mit Modifikationen des Molekülteil A zusammengefasst.	91
55	Dargestellte Phenylelessigsäure-Derivate mit verschiedenen Substituenten am Phenylrest des Molekülteil A und ihre Ausbeuten.	93
56	Dargestellte Phenylpropionsäure-Derivate mit verschiedenen Substituenten am Phenylrest des Molekülteil A und ihre Ausbeuten.	94
57	Dargestellte Zimtsäure-Derivate mit verschiedenen Substituenten am Phenylrest des Molekülteil A und ihre Ausbeuten.	95
58	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für die Phenylelessigsäure-Derivate mit verschiedenen Substituenten am Phenylrest des Molekülteil A zusammengefasst.	96
59	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für die Phenylpropionsäure-Derivate mit verschiedenen Substituenten am Phenylrest des Molekülteil A zusammengefasst.	97

60	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für die Zimtsäure-Derivate mit verschiedenen Substituenten am Phenylrest des Molekülteil A und einem Phenylrest im Molekülteil B zusammengefasst.	98
61	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für die Zimtsäure-Derivate mit verschiedenen Substituenten am Phenylrest des Molekülteil A und einem Benzylrest im Molekülteil B zusammengefasst.	98
62	Exemplarische Dockingpose des Cyano-Derivats Schl-38-157 in der Kristallstruktur des Helikase-Komplexes (PDB:5ZC9).	99
63	Exemplarische Dockingposen von zwei Derivaten mit Modifikationen im Molekülteil B in der Kristallstruktur des Helikase-Komplexes (PDB:5ZC9). . . .	100
64	Dargestellte Phenylelessigsäure-Derivate mit Modifikationen des Molekülteil B und ihre Ausbeuten.	101
65	Dargestellte Phenylpropionsäure-Derivate mit Modifikationen des Molekülteil B und ihre Ausbeuten.	102
66	Dargestellte Zimtsäure-Derivate mit Modifikationen des Molekülteil B und ihre Ausbeuten.	103
67	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für die Phenylelessigsäure-Derivate mit Modifikationen des Molekülteil B zusammengefasst.	104
68	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für die Phenylpropionsäure-Derivate mit Modifikationen des Molekülteil B zusammengefasst.	104
69	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für die Zimtsäure-Derivate mit Modifikationen des Molekülteil B zusammengefasst.	105
70	Dargestellte <i>N</i> -Acylaminosäureamide mit Modifikationen der Molekülteile A und B.	106

71	Dargestellte <i>N</i> -Acylaminosäureamide mit Modifikationen des Molekülteil C und ihre Ausbeuten.	107
72	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene Verbindungen mit Modifikationen des Molekülteil C und einem <i>N</i> -Phenylamid-Rest zusammengefasst.	109
73	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene Verbindungen mit Modifikationen des Molekülteil C und einem <i>N</i> -Benzylamid-Rest zusammengefasst.	110
74	Derivate mit einer Modifikation des Molekülteil C, die eine vielversprechende spezifische Hemmung der Translationseffizienz im DLA gezeigt haben. . . .	111
75	Dargestellte Valin-Derivate mit Modifikationen im Molekülteil A und ihre Ausbeuten.	111
76	Dargestellte Valin-Derivate mit Modifikationen im Molekülteil B und ihre Ausbeuten.	112
77	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene Valin-Derivate mit Modifikationen des Molekülteil A zusammengefasst.	114
78	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene Valin-Derivate mit <i>N</i> -Phenylamid-Rest im Molekülteil B zusammengefasst.	114
79	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene Valin-Derivate mit <i>N</i> -Benzylamid-Rest im Molekülteil B zusammengefasst.	115
80	Dargestellte D-Enantiomere der <i>N</i> -Acylaminosäureamide und ihre Ausbeuten.	116
81	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für die D-Enantiomere der <i>N</i> -Acylaminosäureamide zusammengefasst.	117
82	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen von Schl-38-212	122

83	Übersicht der Verbindungen aus der Stoffklasse der <i>N</i> -Acylaminosäureamide mit einem spezifischen Hemmeffekt auf die Translation.	123
84	(a) und (b) Exemplarische Dockingposen der linearen Sulfonamide (lachsfarben und magenta) in der Kristallstruktur des eIF4A-RNA-Komplexes (PDB:5ZC9). 126	
85	Dockingpose eines propellerartigen Sulfonamids (Schl-38-063 in magenta) in der Kristallstruktur des Helikase-Komplexes (PDB:5ZC9).	127
86	Entwicklung der Stoffklasse der verzweigten Sulfonamide.	128
87	Dockingpose eines verzweigten Sulfonamids (Schl-38-072 in blau) in der Kristallstruktur des eIF4A-RNA-Komplexes (PDB:5ZC9).	128
88	Dargestellte verzweigte Sulfonamide und ihre Ausbeuten.	131
89	Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene verzweigte Sulfonamide zusammengefasst. 132	
90	Zusammenfassung der Ergebnisse der linearen und verzweigten Sulfonamide. Die Hemmung der Translation konnte unter Erhalt der Wirksamkeit von einer Konzentration von 10 μ M auf 1 μ M verbessert werden.	134
91	Strukturen verschiedener Rhodanine und DIELS-ALDER-Addukte. Die orange Markierung kennzeichnet schwach aktive Verbindungen, die ausschließlich einen Effekt auf die Eiproduktion haben.	135
92	Eiproduktion der <i>S. mansoni</i> bei einer Inhibitorkonzentration von 50 μ M. Die Anzahl der Eier wurde alle 24 h an drei aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt und auf die Zahl der Eier der DMSO-Kontrolle des jeweiligen Tages normiert. Bei den Verbindungen wurde der Test bei n = 1 durchgeführt.	136
93	Strukturen der linearen Sulfonamide mit verschiedenen funktionellen Gruppen. 137	
94	Eiproduktion der <i>S. mansoni</i> bei einer Inhibitorkonzentration von 50 μ M. Die Anzahl der Eier wurde alle 24 h an drei aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt und auf die Zahl der Eier der DMSO-Kontrolle des jeweiligen Tages normiert. Bei den Verbindungen wurde der Test bei n = 1 durchgeführt, mit Ausnahme von Schl-35-061 mit n = 2.	138

95	Strukturen der linearen Sulfonamide mit Modifikationen des Strukturelements III.	139
96	Eiproduktion der <i>S. mansoni</i> bei einer InhibitorKonzentration von 50 μM . Die Anzahl der Eier wurde alle 24 h an drei aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt und auf die Zahl der Eier der DMSO-Kontrolle des jeweiligen Tages normiert. Bei den Verbindungen wurde der Test bei $n = 1$ durchgeführt, mit Ausnahme von Schl-38-009 mit $n = 2$	140
97	Eiproduktion der <i>S. mansoni</i> bei einer InhibitorKonzentration von 25 μM und 50 μM . Die Anzahl der Eier wurde alle 24 h an drei aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt und auf die Zahl der Eier der DMSO-Kontrolle des jeweiligen Tages normiert. Bei einer Konzentration von 50 μM wurde der Test bei $n = 2$ und bei einer Konzentration von 25 μM bei $n = 1$ durchgeführt.	142
98	Morphologische Veränderung in Form von Darmdilatationen durch die Behandlung der <i>S. mansoni</i> mit zwei Sulfonamiden bei 25 μM nach 72 h.	143
99	Schematische Darstellung des Ablaufs zur Testung gegen RVFV.	144
100	Strukturen der 13 linearen Sulfonamide, die gegen den RVFV getestet wurden.	145
101	Biologische Ergebnisse aus den Testungen gegen RVFV: Schl-38-006 zeigt eine Hemmung der viralen RNA im Bereich von 17-33 % bei 5-20 μM . Bei Schl-38-012 ist eine Hemmung von ca. 50 % bei 5-10 μM und eine Verringerung des Virustiters um eine halbe Log-Stufe bei 20 μM zu beobachten.	146
102	Strukturen der linearen Sulfonamide und <i>N</i> -Acylaminosäureamide zur Testung gegen den Coronavirus HCoV-229E.	147
103	Virustitration zweier linearer Sulfonamide bei unterschiedlichen Konzentrationen von 0.1 μM bis 10 μM , in MRC5-Zellen getestet. Beide Verbindungen zeigen keinen antiviralen Effekt.	148
104	Virustitration verschiedener Verbindungen bei 1 μM und 10 μM . Bei Schl-38-185 (PP-04-105) ist ein antiviraler Effekt zu sehen.	149

105	Strukturen der linearen Sulfonamide und <i>N</i> -Acylaminosäureamide zur Testung gegen den Coronavirus SARS-CoV-2. Die rot markierte Verbindung zeigte einen antiviralen Effekt.	149
106	Virustitration der drei Verbindungen Schl-38-050 , Schl-38-053 und Schl-38-183 gegen SARS-CoV-2 in Vero E6 Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen.	150
107	Zusammenfassung der Ergebnisse des TSA der aktiven Verbindung mit einer signifikanten Temperaturverschiebung. Die Farben zeigen die Aktivität im DLA an: spezifische Hemmwirkung (grün), keine oder unspezifische Hemmwirkung (rot), zytotoxisch im WST (orange).	153
108	Zusammenfassung der Ergebnisse des TSA der inaktiven Verbindung mit einem signifikanten Temperaturverschiebung. Die Farben zeigen die Aktivität im DLA an: spezifische Hemmwirkung (grün), keine oder unspezifische Hemmwirkung (rot), nicht getestet wegen fehlender Zytotoxizität im WST (blau).	154
109	Zusammenfassung aller biologischen Ergebnisse der vielversprechendsten Verbindungen. Die Farben zeigen die Aktivität im biologischen Test an: Aktivität (grün), keine Aktivität (rot), nicht signifikante Temperaturverschiebung (orange).	156
110	Übersicht der Modifikationen bei den linearen Sulfonamiden mit ihren Auswirkungen auf die Hemmung der Helikase.	158
111	Propellerartige Carbonsäureamide und propellerartige Sulfonamide mit einem unspezifischen inhibitorischen Effekt im DLA.	160
112	Struktur-basiertes Design der <i>N</i> -Acylaminosäureamide: Entwurf passender Struktur motive für die Subtaschen A, B und C schematisch dargestellt.	161

113	Zusammenfassung der Derivate mit unterschiedlichen Strukturmotiven A. Mit Blick auf die Hemmwirkung konnten Verbindungen mit einer Verbindungslänge von $n=1,2$ als eIF4a-spezifisch identifiziert werden. Im Folgenden konnte folglich die Phenylelessigsäure-, Phenylpropionsäure- und Zimtsäure-Struktur zur Adressierung der Subtasche A als Grundstruktur definiert werden.	162
114	Zusammenfassung der aktiven <i>N</i> -Acylaminosäureamide-Derivate.	163
115	Übersicht der Modifikationen der drei Grundstrukturen aus der Stoffklasse der <i>N</i> -Acylaminosäureamide und ihre Auswirkungen auf die Hemmung der Helikase.	164
116	Übersicht der Modifikationen der drei Grundstrukturen aus der Stoffklasse der <i>N</i> -Acylaminosäureamide mit einem Valin in der Subtasche C und ihre Auswirkungen auf die Hemmung der Helikase.	165
117	Entwicklung der Stoffklasse der verzweigten Sulfonamide: (1) Lineare Sulfonamide als Basisstruktur: Ein Strukturmotiv zur Adressierung der Subtasche C fehlt. (2) Propellerartige Sulfonamide besetzen alle drei Subtaschen. Die Kombination der Strukturelemente liefert die verzweigten Sulfonamide, die alle drei Subtaschen ganz (auch B, C) oder weitgehend (A) ausfüllen. . .	166
118	Übersicht der verzweigten Sulfonamide mit einer spezifischen Hemmung der Translation.	166
119	Zusammenfassung der aktiven Verbindungen mit einem antiviralen oder antischtosomalalen Effekt.	167
120	Dockingpose von Silvestrol mit potentiellen Bereichen zum Adressieren der Arginin-Seitenketten und Asp198.	169
121	(a) und (b) Ausblick der möglichen Modifikationen für die Stoffklasse der verzweigten Sulfonamide und der <i>N</i> -Acylaminosäureamide in den nächsten Arbeiten.	169

Tabellenverzeichnis

2	Vergleich von SARS-CoV-1, MERS-CoV und SARS-CoV-2.	24
3	Reaktionsbedingungen zur Darstellung der Verbindungen Schl-38-013 und Schl-38-014	45
4	Reaktionsbedingungen zur Darstellung von Schl-38-010	49
5	Reaktionsbedingungen zur Darstellung von Schl-38-011	49
6	Reaktionsbedingungen zur Darstellung eines sekundären Amins mittels reductiver Aminierung.	63
7	Reaktionsbedingungen zur Darstellung des sekundären Amins mittels einer nucleophilen Substitution.	64
8	Reaktionsbedingungen zur Darstellung des sekundären Amins (109) mittels einer nucleophilen Substitution.	65
9	Reaktionsbedingungen zur Darstellung des sekundären Amins (112) mittels einer nucleophilen Substitution.	65
10	Reaktionsbedingungen zur Darstellung der Ausgangssubstanz (294).	113
11	Zusammenfassung der Motilität und Paarungsstabilität der getesteten Verbindungen.	141
12	Zusammenfassung der Ergebnisse aller im TSA getesteten Verbindungen. . .	182

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
A	Adenin
ACN	Acetonitril
AMP-PNP	Adenylyl-imidodiphosphat
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Arg	Arginin
Asp	Asparaginsäure
ali.	aliphatisch
arom.	aromatisch
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BDBV	Bundibugyo Ebolavirus
BOMV	Bombali Ebolavirus
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
bs	breites Singulett
CAD	<i>cationic amphiphilic drug</i>
CC ₅₀	<i>Cytotoxic concentration of half-maximal reduction of cell viability</i>
3CLpro	<i>3C-like protease</i>
CT	Computertomographie
COVID	<i>coronavirus disease</i>
CoV	Coronavirus
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DEAD	Asparaginsäure (D)-Glutaminsäure (E)-Alanin (A)-Asparaginsäure (D)
DEE	Diethylether
DIPEA	Diisopropylethylamin

DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
d	Dublett
dd	Dublett vom Dublett
dt	Dublett vom Triplett
E	<i>Envelope</i> -Protein
EBOV	Zaire ebolavirus
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
ECMO	extrakorporalen Membranoxygenierung
EDA	Ethylendiamin Diacetat
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDG	<i>electron donating group</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ESCRT	<i>endosomal sorting complexes required for transport</i>
EWG	<i>electron withdrawing group</i>
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
eIF4A	eukaryotischer Initiationsfaktor 4A
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
G	Guanin
GP	Glykoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
Gln	Glutamin
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorphosphat
HCoV	humanes Coronavirus

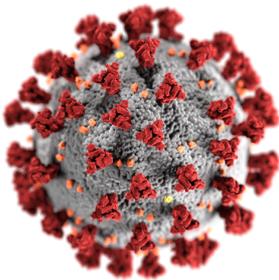
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
h	<i>hour</i>
hACE2	<i>human angiotensin-converting enzyme 2</i>
IgG	Immunoglobulin G
Ile	Isoleucin
kB	Kilobasenpaar
L	RNA-abhängige RNA Polymerase
LM	Lösungsmittel
Leu	Leucin
Lsg.	Lösung
LM	Lösungsmittel
M	Membranprotein
MERS	<i>middle east respiratory syndrome</i>
MOI	multiplicity of infection
MPLC	<i>medium pressure liquid chromatography</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
mAb	<i>monoclonale antibody</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MeOH	Methanol
Met	Methionin
m	Multipllett
m	<i>medium</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NP	Nucleoprotein
NPC1	Niemann-Pick C1 Rezeptor
ORF	<i>open reading frames</i>

PALM	Pamoja Tulinde Maisha
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PMO	<i>phosphorodiamidate morpholino oligomer</i>
PRRA	Prolin (P)- Arginin (R)- Arginin (R)- Alanin (A)
Phe	Phenylalanin
Phg	Phenylglycin
PyBOP	Benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium hexafluorosphat
Pyg	Pyridylglycin
pp	Polyprotein
q	Quartett
qRT-PCR	<i>quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
quint.	Quintett
R ₀	Reproduktionszahl
RBD	<i>receptor-binding domain</i>
RESTV	Reston Ebolavirus
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
RTC	Replikase-Transkriptase-Komplex
RT-PCR	<i>real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
RVFV	<i>Rift-valley-Fever-Virus</i>
RocA	Rocaglamid A
S	<i>Spike-Protein</i>
SAR	<i>structure activity relationship</i>
SARS	Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom
SUDV	Sudan Ebolavirus
s	Singulett
s	<i>strong</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>

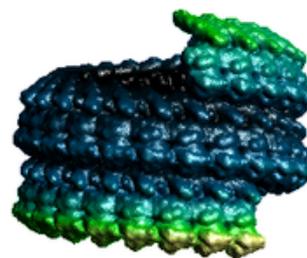
TAFV	Tai Forest Ebolavirus
TAM	Tyrosin Kinase Rezeptor
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIM-1	T-Zellen Immunoglobulin und Mucin 1
TSA	<i>Thermal Shift Assay</i>
t	Triplett
USA	<i>United States of America</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolettstrahlung
VP	Virionprotein
VOC	<i>variant of concern</i>
VOI	<i>variant of interest</i>
Val	Valin
vs	<i>very strong</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WST	<i>water soluble tetrazolium</i>
WW	Wechselwirkung
W	Watt
w	<i>weak</i>

1 Einleitung

RNA-Viren waren im Laufe der Geschichte für viele Epidemien und Pandemien verantwortlich und bergen dieses Potential auch in Zukunft, da sie im Vergleich zu den DNA-Viren eine sehr hohe Mutationsrate aufweisen. Grund hierfür sind die Instabilität der RNA und die niedrige Genauigkeit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase bei der Replikation, da sie über keinen Mechanismus zur Fehlerkorrektur falscher Basenpaarungen verfügt.^{[1],[2]} So entstehen nach einigen Replikationszyklen verschiedene genetische Varianten mit unterschiedlichen Eigenschaften. Dadurch sind RNA-Viren sehr anpassungsfähig und können durch Mutationen der Wirkung antiviraler Wirkstoffe oder der Neutralisation durch Impfstoffe entfliehen.^[1] Das Auftreten verschiedener Varianten stellt auch in der derzeitigen SARS-CoV-2 Pandemie eine Herausforderung dar, da die neuen Varianten teilweise leichter übertragen werden. Darüber hinaus besteht die Sorge, dass die aktuellen Impfstoffe eine verringerte Wirksamkeit gegen die Varianten aufweisen können.^{[3],[4]} Neben den Coronaviren wie SARS-CoV-2 (Abbildung 1a), SARS-CoV-1 und MERS-CoV, die bereits für Ausbrüche verantwortlich waren, zählen auch Flaviviren, wie das Dengue-, West-Nil- und Zikavirus, und Filoviren mit den verschiedenen Ebola-Spezies (Abbildung 1b) zu den Pathogenen, die eine globale Bedrohung darstellen können. So zeigte sich in der Vergangenheit bereits an der Russischen Grippe mit ungefähr 1 Millionen Todesfällen und der Spanischen Grippe mit ungefähr 50 Millionen Todesfällen die Auswirkungen und Tragweite dieser RNA-Viren.^[2] Die aktuelle COVID19 Pandemie forderte nach etwa 1.5 Jahren bereits mehr als 4 Million Opfer.^[5] Umso dringlicher ist die Erforschung und Entwicklung antiviraler Wirkstoffe.



(a) Coronavirus SARS-CoV-2 Virion.^[6]



(b) Ebolavirus Nukleokapsid-RNA-Komplex.^[7]

Abbildung 1: Graphische Darstellung des Coronavirus und Ebolavirus (PDB:5Z9W).

1.1 Ebolavirus

1.1.1 Ursprung und Arten

Das Ebolavirus gehört zur Familie der *Filoviridae* aus der Ordnung der *Mononegavirales*. Zu den Filoviren zählt auch die Gattung des Marburgvirus sowie des Cuevavirus.^[8] Die Gattung des Ebolavirus besteht aus den folgenden sechs Spezies: *Zaire ebolavirus* (Ebolavirus, EBOV), *Sudan ebolavirus* (Sudavirus, SUDV), *Tai Forest ebolavirus* (Tai Forest Virus, TAFV), *Bundibugyo ebolavirus* (Bundibugyovirus, BDBV), *Reston ebolavirus* (Restonvirus, RESTV) und *Bombali ebolavirus* (Bombalivirus, BOMV). Alle Spezies sind humanpathogen mit Ausnahme des Restonvirus und des neu entdeckten Bombalivirus.^[9] Im Jahr 1976 wurde das Marburgvirus als erster Vertreter der Filoviren entdeckt. Parallel wurden das EBOV und das SUDV identifiziert. In den Jahren 1989-1990 tauchte das RESTV in den Philippinen, 1994 das TAFV in der *Cote d'Ivoire* (früher auch *Cote d'Ivoire ebolavirus* genannt)^[8] und 2007 das BDBV in Uganda auf.^[10]

1.1.2 Aufbau und Struktur

Bei dem Ebolavirus handelt es sich um ein RNA-Virus mit einem nicht-segmentierten (-)RNA-Einzelstang-Genom mit ca. 19 kB. Im Genom sind folgende sieben virale Proteine kodiert: das Nukleoprotein (NP), das Virionprotein (VP) 35, das Matrixprotein (VP40), das Glykoprotein (GP), VP30, VP24 und die RNA-abhängige RNA Polymerase L (L) (Abbildung 2). Am Anfang ist eine 3'-Leader-Sequenz und am Ende eine 5'-Trailer-Sequenz definiert, die die Promotorsequenz der Replikation und RNA Verpackungssignale enthalten. Jedes Gen kodiert hierbei ein Protein abgesehen von GP, das drei Glykoproteine beinhaltet. Die genomische Struktur der verschiedenen Ebolaspezies unterscheidet sich nur um 25-35 %.^[8]

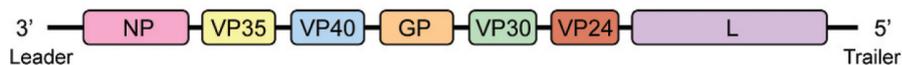


Abbildung 2: Genomische Struktur des Ebolavirus. Unverändert übernommen aus ^[9].

Das Virion besitzt eine fadenförmige Struktur mit einem Durchmesser von 50-80 nm und einer Länge von 10-14 μM . Die Form kann variieren und einem Zylinder oder einer Schleife ähneln.^[8] In Abbildung 3 ist ein einzelnes Virion des Ebolavirus und in Abbildung 4 der schematische Aufbau eines Virions mit seinen Proteinen veranschaulicht.



Abbildung 3: Virion des Ebolavirus. Unverändert übernommen aus ^[11].

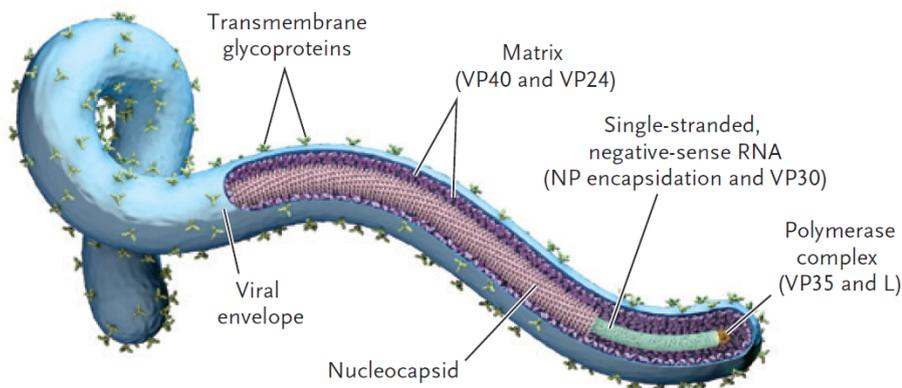


Abbildung 4: Aufbau des Ebolavirus. Unverändert übernommen aus ^[10].

Das Virion besteht aus einer viralen Membran mit *Spike*-Proteinen, die aus trimeren transmembranen Glykoproteinen gebildet werden. Innerhalb der Membran befindet sich das Nucleokapsid, bestehend aus dem Nucleoprotein, der Polymerase L, VP35 und VP30. Dieses Nucleokapsid ist von den Matrixproteinen VP40 und VP24 umgeben.^[10] Die Aufgaben der unterschiedlichen viralen Proteine sind im Folgenden kurz zusammengefasst.

Nukleoprotein (NP)	Enkapsidierung des Genoms und Schutz der viralen RNA gegen zelluläre Nukleasen
Glykoprotein (GP)	Andocken des Virus an die Zellmembran des Wirtes und Einschleusen des Nukleokapsids in das Zytoplasma des Wirtes
VP24	Matrixprotein; wichtig bei Nukleokapsid Zusammenstellung, Virus Freisetzung und Unterdrückung der Immunantwort
VP30	Transkriptionsfaktor; Aktivierung der RNA-Synthese; Unterdrückung der RNA-Interferenz (<i>Silencing</i>)
VP35	entscheidend für Bildung des Nukleokapsids und Dissoziation des NP-RNA-Komplexes; Unterdrückung der angeborenen Immunantwort
VP40	Matrixprotein; notwendig für Virus Assemblierung und verantwortlich für die fadenförmige Struktur des Virions sowie Aufrechterhaltung der Formbeständigkeit
Polymerase L	als Teil des Nukleokapsid-Komplexes verantwortlich für virale Transkription und Replikation; Bildung von (+)mRNA aus (-)RNA zur Synthese der Ebolaproteine ^{[8],[12]}

1.1.3 Replikation und Lebenszyklus

Die Replikation des Ebolavirus erfolgt im Zytoplasma der Wirtszelle und ist schematisch in Abbildung 5 gezeigt. Das Virion bindet im ersten Schritt mithilfe der Glykoproteine an die Zelloberfläche des Wirtes. Dabei handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, der nach der Abspaltung von zwei extrazellulären exponierten Regionen des Glykoprotein Komplexes durch Cystein Proteasen zu der Exposition der Rezeptor-Bindungsdomäne (RBD) des Glykoproteins im endosomalen/lysosomalen Kompartiment führt. So kann das Glykoprotein im nächsten Schritt an den Niemann-Pick C1 Rezeptor (NPC1), einen transmembranen endosomalen Cholesterin Rezeptor, binden und eine Fusion des Virions mit der endosomalen Membran ermöglichen.^{[9],[10]} Die initiale Adsorption an die Wirtszelle kann aber auch über das C-Typ Lectin erfolgen. Es werden weitere Oberflächenrezeptoren wie das β 1-Integrin, der Folatrezeptor- α , Tyro3, Axl, Mer (TAM) Tyrosin Kinase Rezeptor, T-Zellen Immunoglobulin und Mucin 1 (TIM-1) als Bindungsstellen vorgeschlagen. Der Eintritt des Virions in die Zelle

wird mittels einer Makropinozytose möglich. Im Prozess der Endozytose wird das Virion in die Zelle eingestülpt und aufgenommen. Bei einem niedrigen pH-Wert wird die Fusion der Zellmembran des Wirtes und des Virions durch das Glykoprotein vervollständigt.^[8]

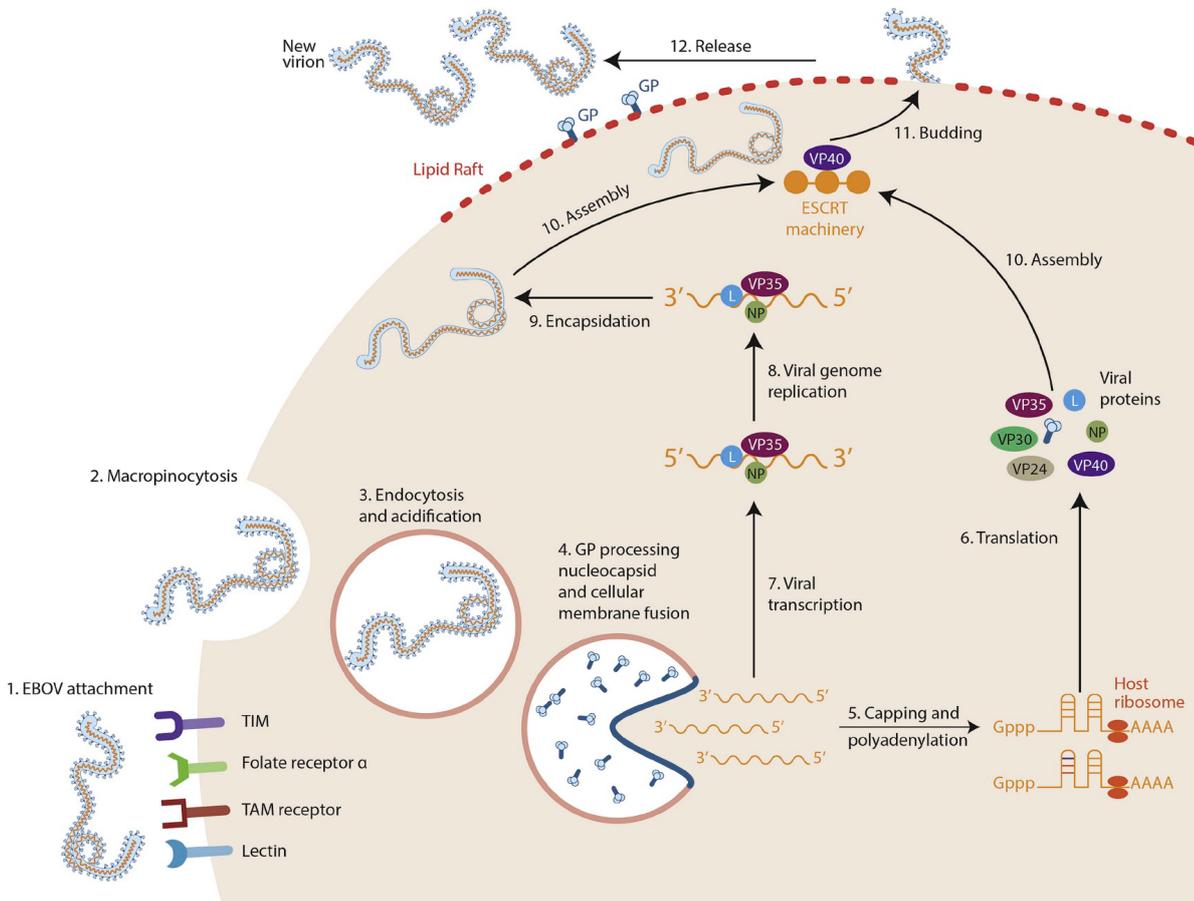


Abbildung 5: Replikationszyklus des Ebolavirus: Zunächst erfolgt die Adsorption des Virions an die Oberflächenrezeptoren des Wirtes (1). Anschließend wird das Virion über eine Endozytose in die Zelle aufgenommen und das Nukleokapsid freigesetzt (2-4). Mithilfe der viralen Nukleokapsidproteine wird die virale Transkription des Genoms (7) sowie die Translation der viralen Proteine durch die wirtseigenen Ribosome (6) nach einem vorangegangenen Capping und einer Polyadenylierung der RNA (5) gestartet. Im einem Replikationsprozess wird das virale Genom vervielfältigt und danach enkapsidiert (8-9). Zuletzt erfolgt der Zusammenbau der Viruskomponenten, deren Knospung und Freisetzung aus der Zelle (10-12). Abbildung unverändert übernommen aus ^[8].

Anschließend erfolgt die Freisetzung des viralen Genoms im Zytoplasma. In der Zelle wird die negativ-orientierte RNA in einem primären Transkriptionsschritt mithilfe des eigenen Nu-

kleokapsid Komplexes in eine mRNA umgeschrieben. Die virale mRNA wird dann mithilfe der wirtseigenen Translationsmaschinerie in die viralen Proteine translatiert. Die Replikation erfolgt mithilfe des viralen Polymerase Komplexes (NP, VP35, L). Zunächst wird ein positiv-orientiertes RNA-Antigenom, das als Vorlage für die Synthese des negativ-orientierten RNA-Genoms dient, gebildet. Dieses RNA-Antigenom nutzt der virale Polymerase Komplex zur Synthese des Genoms, das anschließend enkapsidiert wird. Der Zusammenbau (*Assembly*) der viralen Proteine und des enkapsidierten viralen Genoms folgt im nächsten Schritt und sie werden zur Plasmamembran transportiert. Zusammen mit der wirtseigenen ESCRT Maschinerie ermöglicht VP40 die Knospung und die Freisetzung des neuen Virions.^[8]

1.1.4 Immunantwort

Nach der Infektion folgt die angeborene Immunantwort des Wirtes. Bestandteil der Immunantwort sind die dendritischen Zellen, Makrophagen, Monozyten, die natürlichen Killerzellen und neutrophilen Granulozyten. Bei einer Infektion durch das Ebolavirus ist in erster Linie die Fehlregulierung der dendritischen Zellen und Makrophagen zu beobachten. Es kommt aufgrund einer übermäßigen Aktivierung der Makrophagen zu einer Überexpression von proinflammatorischen Zytokinen. Bei den dendritischen Zellen dagegen wird die Aktivierung blockiert und sie können nicht heranreifen. Dies führt folglich zu einer Hemmung der adaptiven Immunantwort. Auch bei den Genen, die die Produktion der neutrophilen Granulozyten codieren, kommt es zu einer Überexpression, was wahrscheinlich eine Autoimmunantwort auslöst. Die Rolle der natürlichen Killerzellen ist noch nicht genau geklärt.^[8]

1.2 Ebolavirus Erkrankung

1.2.1 Übertragungswege

Seit der Entdeckung des Ebolavirus waren die meisten Ausbrüche in Zentral- und Westafrika zu verzeichnen. Als natürliches Reservoir werden die afrikanischen Flughunde angenommen,^[8] obwohl der Versuch der Isolierung des Virus bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht erfolgreich war. Mögliche Ursachen könnten eine geringe Viruslast, die geringe Empfind-

lichkeit der Zelllinien oder das Vorhandensein von Inhibitoren im Gewebe des Flughundes sein.^[10] Die Flughunde können das Ebolavirus auf Gorillas, Schimpansen, Antilopen und andere Wildtiere übertragen, die als Zwischenwirte dienen können. Der Kontakt und Verzehr des infizierten Wildes in diesen Regionen ermöglichen die Übertragung des Virus auf den Menschen. Von Mensch zu Mensch wird das Virus durch den direkten Kontakt einer offenen Wunde oder der Schleimhäute mit infizierten Flüssigkeiten, wie zum Beispiel Urin, Speichel, Schweiß, Muttermilch und Samenflüssigkeit, übertragen.^[8] Ein hoher Risikofaktor der Übertragung ist der Umgang mit den infizierten Verstorbenen bei den Bestattungsritualen in den Regionen, in denen das Virus endemisch ist.^[10]

1.2.2 Symptome

Die Inkubationszeit des Ebolavirus beträgt 2-21 Tage. Innerhalb dieses Zeitraums weisen ca. 95 % der Patienten Symptome auf.^[12] Die Krankheitsverläufe einer Ebolavirus-Infektion variieren von asymptomatischen und milden Verläufen bis hin zu schweren Erkrankungen, die lethal sein können. Dies ist sehr speziesabhängig. So verläuft eine Infektion mit dem RESTV asymptomatisch, wohingegen Infektionen mit BDBV, SUDV und EBOV mit dem typischen hämorrhagischen Fieber und Mortalitätsraten von 25 %, 50 % und 80 % einhergehen.^[8] Der Krankheitsverlauf einer Ebolavirus Erkrankung kann in drei Phasen eingeteilt werden:

1. Infektiöse Prodomalphase
2. Akute Phase (tödliche Erkrankung)
3. Chronische/Genesungsphase

In der ersten Phase (2-21 Tage) treten nicht-spezifische Symptome wie Unwohlsein, hohes Fieber, Müdigkeit sowie Muskel- und Gelenkschmerzen auf. Zwischen dem 7. und 14. Tag nach der Infektion kommt es zu Übelkeit, Erbrechen und Diarrhöe, zusammen mit einem großen Flüssigkeitsverlust von ungefähr 10 L pro Tag. Dies sind erste Indikatoren für einen schwerwiegenderen Krankheitsverlauf. In der zweiten Phase (22-35 Tage) entwickeln die Patienten neben dem hämorrhagischen Fieber lebensgefährliche Symptome wie einen septischen Schock, eine metabolische Acidose und Organversagen. Es kann auch zu Hämatochezie (Blut

im Stuhl) oder Meläna (schwarze Färbung des Stuhls), Hämaturie, Hämoptoe und Zahnfleisch- oder Nasenbluten kommen. Nierenversagen und Muskelversagen sind Hinweise auf einen tödlichen Verlauf der Krankheit. Risikofaktoren für einen tödlichen Verlauf der Krankheit sind unter anderem das Alter und Geschlecht. So neigen Kinder zu einem schweren Verlauf. Bei Schwangeren beträgt die Mortalität sogar bis zu 95.5 %. In der Genesungsphase kann das Ebolavirus durch seinen Verbleib im Körper auch Monate nach der Infektion erneut ausbrechen und übertragen werden. Die Überlebenden einer Infektion leiden teilweise am *post-Ebola virus disease syndrome* und haben allgemeine Symptome wie zum Beispiel Fieber, Müdigkeit und Schwäche oder muskuloskelettale, kutane, gastrointestinale, neurologische, auditive, okuläre oder urogenitale und gynäkologische Symptome.^[8] Während der Epidemie 2013-2016 traten vor allem muskuloskelettale Schmerzen, Kopfschmerzen, Encephalitis (Gehirnentzündung) und okuläre Probleme auf.^[10]

1.2.3 Diagnose und Behandlung

Die Diagnose einer Ebolavirus Infektion erfolgte lange mithilfe eines *in vitro* Assays vom Typ ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), das die Antikörper detektiert. In den letzten Jahren wurde die Diagnose mittels qRT-PCR (*quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction*) gestellt. Da die Viruslast in den frühen Phasen der Infektion gering ist, kann eine negative qRT-PCR ein falsch-negatives Ergebnis liefern und muss nach 72 h wiederholt werden, da die Viruskonzentration 3-6 Tage nach den ersten Symptomen deutlich höher ist.^[8]

Im Vordergrund steht die unterstützende Pflege und symptomatische Behandlung der Ebola Patienten. Durch den hohen Flüssigkeitsverlust während der Krankheit müssen der Wasserhaushalt des Patienten sowie seine Elektrolyte reguliert werden. Es können auch Medikamente zur Behandlung der Diarrhöe und gegen das Erbrechen verabreicht werden. Darüber hinaus muss auch die Blutgerinnung kontrolliert und bei Lungenversagen Sauerstoff zugeführt werden.^[12] Als erster Impfstoff zur prophylaktischen Behandlung einer Infektion durch den EBOV wurde Ervebo (rVSVΔG-ZEBOV-GP) im Dezember 2019 von der FDA (*U.S. Food and*

Drug Administration) zugelassen. Der Impfstoff wird einmal injiziert und kann allen Erwachsenen ab 18 Jahren verabreicht werden.^{[13],[14]} Als vorläufiges Ergebnis konnte eine Wirksamkeit von 97.5 % bei einem Ausbruch 10 Tage nach der Impfung und eine Wirksamkeit von 88.1 % unabhängig vom Zeitpunkt der Impfung ermittelt werden.^[10] Im Oktober 2020 wurde Inmazeb (atoltivimab, maftivimab, odesivimab-ebgn) zur Behandlung des EBOV von der FDA zugelassen und stellte einen Durchbruch in der Bekämpfung des EBOV dar. Dabei handelt es sich um einen Cocktail aus drei monoklonalen Antikörpern, die gleichzeitig an das Glykoprotein auf der Oberfläche des Virions binden und so die Adsorption an die Rezeptoren des Wirtes und den Eintritt in die Zelle verhindern. Inmazeb wird intravenös in einer einzigen Injektion an Erwachsene und pädiatrische Patienten verabreicht und kann Fieber, Schüttelfrost, Tachykardie sowie Übelkeit verursachen. In der PALM (Pamoja Tulinde Maisha) Studie konnte eine Mortalität von 33.8 % der mit Inmazeb behandelten Patienten bestimmt werden, während bei den Patienten in der Kontrollgruppe die Mortalität mit 51 % deutlich höher lag.^[15] Zwei Monate nach der Zulassung von Inmazeb folgte die FDA-Zulassung von Ebanga (Ansuvimab-zykl). Auch hierbei handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, der das Glykoprotein des Virions adressiert und so den Eintritt in die Zelle des Wirtes blockiert. Ebanga wird in gleicher Weise wie Inmazeb verabreicht und führt zu einer ähnlichen Reaktion des Körpers. In der PALM Studie konnte eine Mortalität von 35.1 % bei einer Therapie mit Ebanga und eine Mortalität von 49.4 % bei einer Behandlung mit der Kontrollsubstanz (ZMapp) beobachtet werden.^{[16],[17]} Beide Antikörper-Präparate haben folglich eine ähnlich hohe Wirksamkeit. Nachteile dieser (*monoclonale antibody*) mAb-Präparate sind ihre hohen Produktionskosten, der Zeitfaktor und ihre hohe Virusspezifität. Dadurch leidet die Wirksamkeit stark unter Mutationen und Veränderungen des Virus.^[9] Weitere Ansatzpunkte zur Entwicklung von Wirkstoffen gegen den Ebolavirus sind in Kapitel 1.3 (S.11) näher beschrieben.

1.2.4 Ebola Virus Ausbrüche

Seit der Entdeckung des Ebolavirus im Jahre 1976 kam es immer wieder zu kleinen lokalen Ausbrüchen, die vorwiegend in Zentral- und Westafrika lokalisiert waren.^[8] Der größte Ausbruch fand in den Jahren 2014-2016 statt und führte zu mehr als 28 600 Infektionen und

11 325 Todesfällen (Mortalitätsrate von ca. 40 %).^{[8],[18]} Die am härtesten betroffenen Länder waren Guinea, Liberia und Sierra Leone. Darüber hinaus nahm der Ausbruch epidemische Ausmaße an, als weitere sieben Länder, darunter auch europäische Länder und die USA, Fälle aufwiesen (Abbildung 6).^[18] Diese Epidemie wurde durch eine einzige Infektion eines 18-Monate alten Jungen in einem kleinen Dorf in Guinea verursacht.^[8] Die rasante Verbreitung des Virus war aufgrund der Schwächen des Überwachungssystems und der Infrastruktur des Gesundheitssystems der betroffenen Länder möglich.^[18] Zu dem größten Ausbruch in der Demokratischen Republik Kongo und dem zweitgrößten Ebola-Ausbruch bis heute zählt der Ausbruch in den Jahren 2018-2020 mit 3470 Infizierten und 2287 Todesfällen (Mortalitätsrate von ca. 66 %). Auch Uganda war betroffen und verzeichnete zum ersten Mal Infektionen durch den EBOV.^[19] Während dieser Epidemie kam Unruhe in der Bevölkerung auf, durch die es zu Angriffen auf die Ebola Treatment Center kam.^[9] Die seit der Entdeckung des Ebolavirus immer wieder aufgetretenen Ausbrüche und seine rasante Ausbreitung während der größten Epidemie 2014-2016 verdeutlichen die Signifikanz der Forschung und Entwicklung in diesem Bereich und zeigen die Notwendigkeit auf, neben Erbebo nach weiteren Impf- und Wirkstoffen zu forschen.

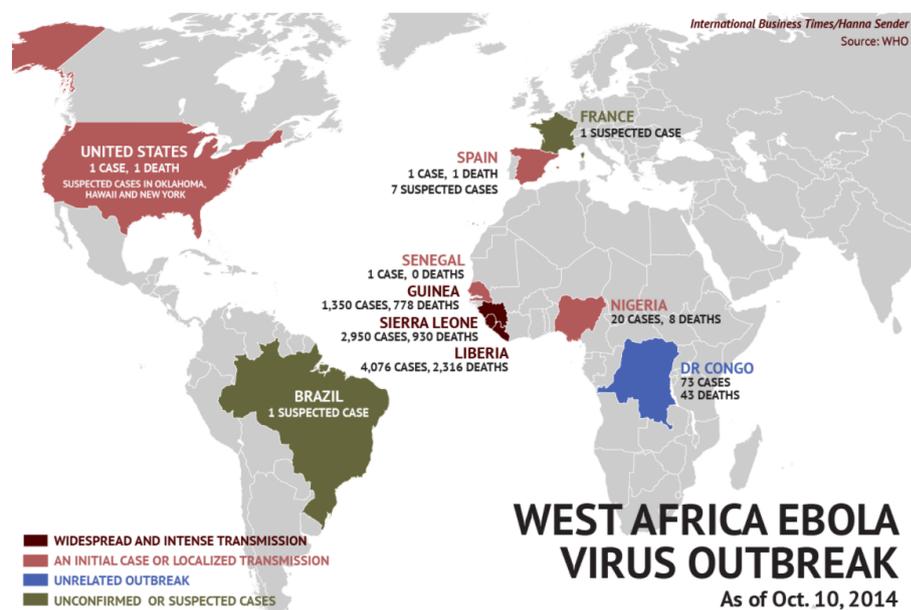


Abbildung 6: Ebola Epidemie 2014-2016: Ausbreitung in der Welt mit Fallzahlen. Unverändert übernommen aus ^[20].

1.3 Ansatzpunkte zur Entwicklung von Wirkstoffen gegen das Ebolavirus

Wirkstoffe gegen das Ebolavirus können in zwei Gruppen eingeteilt werden: die Wirkstoffe, die den Wirt und die, die das Virus adressieren. Zu den Wirkstoffen, die den Wirt adressieren, zählen unter anderem verschiedene Lectine und CADs (*cationic amphiphilic drug*). Im Folgenden werden nur die Therapiansätze, die das Virus direkt inhibieren, genauer beschrieben. Zurzeit befinden sich einige Therapiemöglichkeiten in den klinischen Phasen. Zum einen zeigte ein mAb-basierter Ansatz, der das Glykoprotein des Ebolavirus als Zielprotein hat, eine hohe Wirksamkeit in klinischen Studien. Zum anderen wurde Remdesivir als vielversprechender Kandidat untersucht, was in Kapitel 1.4 (S.13) genauer beschrieben wird.^[9]

1.3.1 Antikörper

Eine Antikörper-Behandlung als Therapieansatz war vor dem großen Ebola Ausbruch in Westafrika umstritten. Erst in dieser Zeit fanden die ersten klinischen Studien mit mAb-Präparaten statt. So wurden verschiedene Antikörper Cocktails, wie ZMapp, ZMAb oder MIL77 verabreicht. Aufgrund der Anwendung weiterer experimenteller Therapien an den Patienten konnte jedoch keine klare Aussage über die Wirksamkeit getroffen werden. Während des Ausbruchs 2018-2020 in der Demokratischen Republik Kongo wurden drei weitere mAb-Ansätze (ZMapp, REGN-EB3 und mAB114) getestet. Dabei wiesen REGN-EB3 und mAB114 eine deutlich bessere Wirksamkeit als ZMapp auf. Im Oktober 2020 erhielt REGN-EB3 dann als Inmazeb die FDA-Zulassung. Ein Nachteil dieser Behandlung ist die hohe Spezifität gegenüber dem Virus. In neuen Ansätzen soll eine breitere Wirksamkeit erzielt werden.^[9]

1.3.2 Small interfering RNA (siRNA)

Einer der frühen Ansätze bestand darin, durch die Nutzung von siRNA die Translation der viralen Proteine zu unterbinden. Dies sollte durch einen Abbau der viralen mRNA (TKM-Ebola) oder der PMO (*phosphorodiamidate morpholino oligomer*) erreicht werden. TKM-Ebola adressiert die viralen Proteine VP35, VP24 und L, sodass die Initiierung der angebo-

renen Immunantwort verhindert wird. Verschiedene Formulierung wurden im Laufe der Zeit während der Ebola Ausbrüche getestet. Es konnte jedoch noch keine eindeutige Wirksamkeit nachgewiesen werden.^[9]

1.3.3 Nukleos(t)id-Analoga

Bei den Nukleos(t)id-Analoga handelt es sich um kleine Moleküle, die das Virus direkt adressieren. Vorteile dieser Verbindungen sind ihre geringen Produktionskosten, der geringe Zeitaufwand sowie die breite Anwendungsmöglichkeit durch ihre geringere Virusspezifität. Zu den bekanntesten bisher zählen Galidesivir (BCX4430), Favipiravir (T-705) und Remdesivir (GS-5734) (siehe Abbildung 7). Galidesivir und Remdesivir sind Adenosin-Analoga, die als Terminator in der RNA-Kette fungieren und die RNA-abhängige RNA-Polymerase hemmen. Galidesivir wurde ursprünglich für die Behandlung des Hepatitis C Virus entwickelt und zeigt später einen inhibitorischen Effekt gegen das Marburgvirus. Auch Remdesivir zeigte in *in vitro* Testung eine Hemmung gegen ein breites Spektrum von RNA-Viren. Ein ähnlich großes Spektrum gegen RNA Viren zeigt Favipiravir, ein Pyrazin-Derivat, das ursprünglich gegen Influenzaviren entwickelt wurde. Favipiravir agiert als Purin-Analogen und erhöht zum einen die RNA Mutationsrate und führt zum anderen zu einem frühen Kettenabbruch. In *in vitro* Testungen war nur eine moderate Wirksamkeit gegen Ebolaviren zu beobachten.^[9]

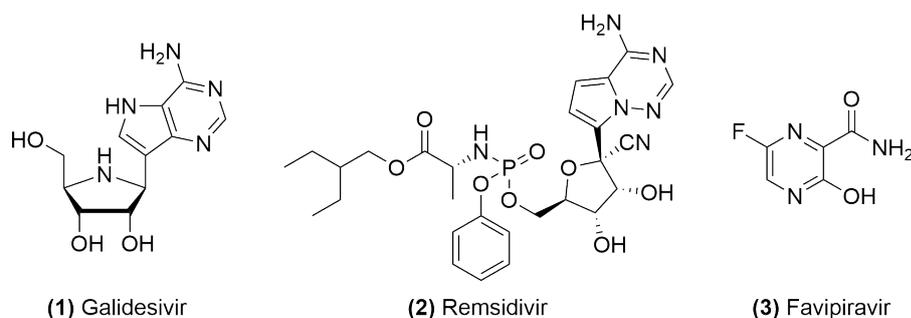


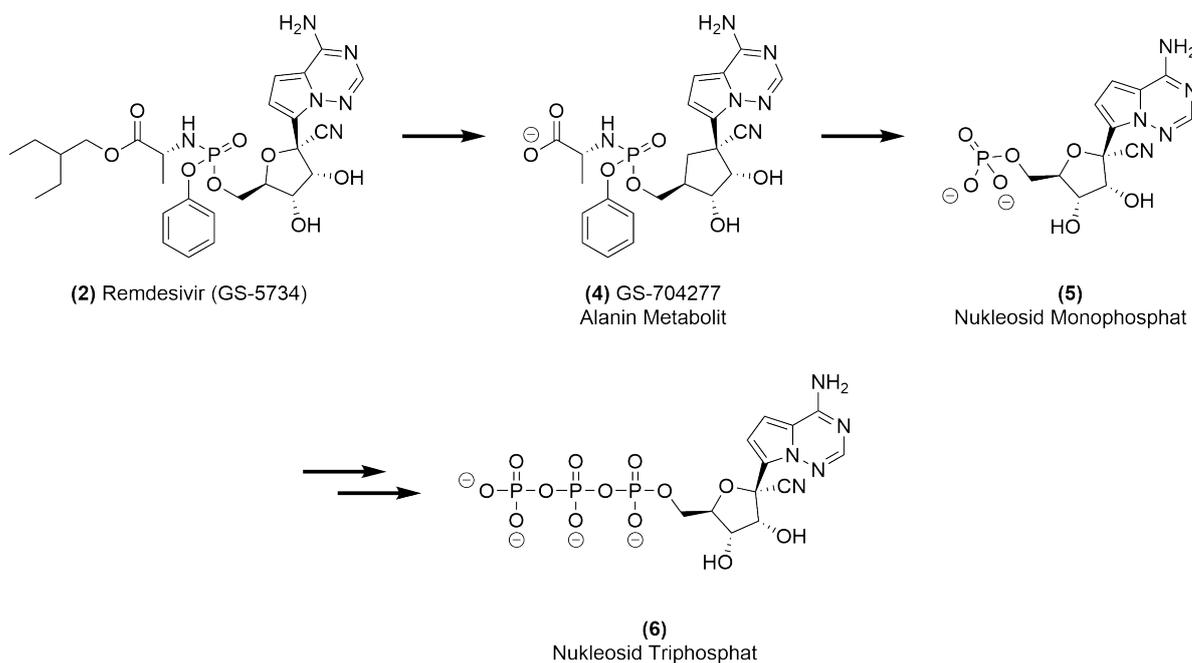
Abbildung 7: Strukturen von Galidesivir, Remdesivir und Favipiravir.^{[21],[22]}

1.4 Remdesivir: Von Ebola zu SARS-CoV-2

Remdesivir zeigte in *in vitro* Assays als erstes *small molecule* einen inhibitorischen Effekt gegen das Ebolavirus und das Marburgvirus.^[9] Sein antiviraler Effekt deckt ein breites Spektrum an RNA Viren ab, wie das Nipahvirus, Hendravirus, MERS (*Middle East Respiratory Syndrome*) und SARS-CoV (*Severe Acute Respiratory Syndrome*).^{[9],[23]} Remdesivir wurde neben drei Antikörper-Therapien in den PALM Studien während des Ebola Ausbruchs in der Demokratischen Republik Kongo untersucht und zeigte im Vergleich eine geringere Wirksamkeit.^[9] In diesen Studien konnten jedoch wichtige Erkenntnisse über die Sicherheit des Wirkstoffs gewonnen werden.^[23] Als Anfang 2020 die durch das SARS-Cov-2 verursachte Pandemie ausbrach, wurde Remdesivir als vielversprechender Inhibitor zur Bekämpfung des Coronavirus untersucht (*drug repurposing*). *In vitro* Studien ermittelten ein EC_{50} von $0.77 \mu\text{M}$ für die Hemmung der Virusreplikation, die mit einer hohen Selektivität einherging. Zusammen mit den Erkenntnissen zur Sicherheit des Wirkstoffs aus den Ebolastudien machten diese Ergebnisse Remdesivir zu einem vielversprechenden Kandidaten in der Wirkstoffentwicklung gegen SARS-CoV-2. Es wurden verschiedene Studien zur Wirksamkeit von Remdesivir durchgeführt, diese lieferten jedoch keine eindeutigen Ergebnisse. Basierend auf dem Ergebnis, dass Remdesivir die Genesung beschleunigt und den Krankenhausaufenthalt verkürzt, erhielt es im Mai 2020 eine Notfallzulassung von der FDA unter dem Namen VEKLURY®. Im Oktober 2020 wurde in einer Studie der WHO (*world health organisation*) SOLIDARITY jedoch der Schluss gezogen, dass eine Einnahme von Remdesivir keinen bzw. nur einen sehr geringen Effekt auf die Mortalität und die Dauer des Krankenhausaufenthalts hat. Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten vom unterschiedlichen Design der Studien herrühren.^[23]

Bei Remdesivir handelt es sich um ein von *Gilead Sciences* entwickeltes Adenosin-Analogon, welches als Prodrug fungiert. In Schema 1 ist die Struktur von Remdesivir und dessen metabolischer Abbau gezeigt. In der Zelle wird Remdesivir zum entsprechenden Alanin-Derivat (**4**) metabolisiert, das weiter zum Monophosphat (**5**) umgesetzt wird. In weiteren Schritten bildet sich das aktive Triphosphat (**6**), das kompetitiv mit ATP agiert und die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase hemmt.^[23] Der aktive Metabolit interagiert mit dem aktiven Zentrum des

Enzyms.^[24] Nach dem Einbau von Remdesivir findet die Synthese noch für weitere drei Nucleotide statt, bevor es zu einem Kettenabbruch kommt. Nach der derzeit vorliegenden Hypothese wird als Grund für den Kettenabbruch angenommen, dass eine sterische Hinderung zu einer Störung der Positionierung der RNA und einer Hinderung der Translokation zur nächsten Position führt.^[25] Es wird angenommen, dass Remdesivir als *chain terminator* oder *delayed chain terminator* fungiert.^{[23],[26]} Nucleotid-Analoga, wie Remdesivir, haben eine beschränkte Wirksamkeit wegen der Leserasterfunktion der Exonuklease, die das Genom des Coronavirus aufrechterhält und fehlerhafte mutagene Nucleotide entfernen kann.^[25]



Schema 1: Remdesivir als Prodrug mit Metabolisierung im Körper. Verändert übernommen aus ^[23].

1.5 Coronavirus

1.5.1 Ursprung und Arten

Das Coronavirus (CoV) gehört zu der Familie der *Coronaviridae* und der Subfamilie der *Orthocoronaviridae* aus der Ordnung der *Nidovirales*. Alle Coronaviren haben einen zoonotischen Ursprung und lösen respiratorische und intestinale Infektionen im Menschen und in Tieren aus. Die Coronaviren können in vier Gattungen eingeteilt werden: α -CoV, β -CoV, γ -CoV und δ -CoV. Die α -CoV und β -CoV können verschiedene Säugetiere, wie Fledermäuse, Nutz- und Haustiere oder Menschen, infizieren. Die γ -CoV und δ -CoV betreffen dagegen Vogelarten und nur manchmal Säugetiere.^[27] Seit der Entdeckung des ersten Coronavirus im Jahre 1937 bis zum heutigen Zeitpunkt wurden sieben humane Coronaviren (HCoV) identifiziert. Vier dieser humanen Coronaviren (α -CoV: HCoV-NL63, HCoV-229E; β -CoV: HCoV-OC43 und HCoV-HKU1) verursachen nur milde grippale Infekte, wohingegen drei humanpathogene Coronaviren der Gattung β -CoV zu akuter Atemnot und Lungenversagen mit Todesfolge führen können.^{[27],[28]} Zu den drei humanpathogenen Coronaviren der Gattung β -CoV zählen SARS-CoV-1 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus*), MERS-CoV (*Middle East respiratory syndrome coronavirus*) und SARS-CoV-2, die im 21. Jahrhundert für große Epidemien und Pandemien verantwortlich waren und noch sind.^[27]

1.5.2 Aufbau und Struktur

Bei SARS-CoV-2 handelt es sich um einen Virus mit einer nicht-segmentierten, positiv-orientierten Einzelstrang-RNA mit einem Genom von ca. 29 kB. Es besitzt eine sphärische oder pleomorphe Struktur. In Abbildung 8 ist die schematische Darstellung der Virusstruktur gezeigt. Die Hülle des Virions besteht aus dem *Spike*-Protein (S), dem Membranprotein (M) und dem *Envelope*-Protein (E). In der Hülle befindet sich das Nukleoprotein (N) mit der genomischen RNA.^[27]

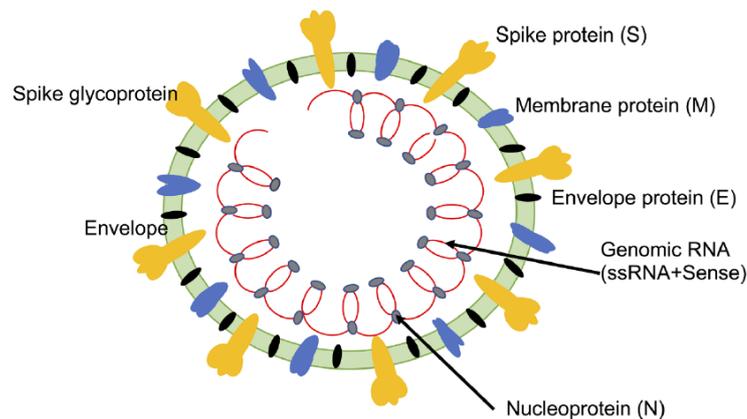


Abbildung 8: Schematische Darstellung des SARS-CoV-2 Virus. Unverändert übernommen aus ^[27].

Das Genom von SARS-CoV-2 (Abbildung 9) ist in sechs funktionale *open reading frames* (ORFs) aufgeteilt: die Replikase (ORF1a und ORF1b), die *Spike*- (S), die *Envelope*- (E) und die Membran-Proteine (M) sowie das Nukleokapsid (N). Darüber hinaus enthält das Genom sieben weitere ORF, die zwischen den funktionalen ORFs liegen, neun sub-genomische mRNAs, neun Elemente, die die Transkription regulieren, und zwei terminale UTRs (*untranslated regions*). Die Replikase am 5'-Ende des Genoms kodiert zwei große Polyproteine (pp1a und pp1b), die proteolytisch in 16 Nichtstrukturproteine gespalten werden, die an der Transkription und Replikation beteiligt sind und für die Aufrechterhaltung des Genoms verantwortlich sind.^{[27],[29]}

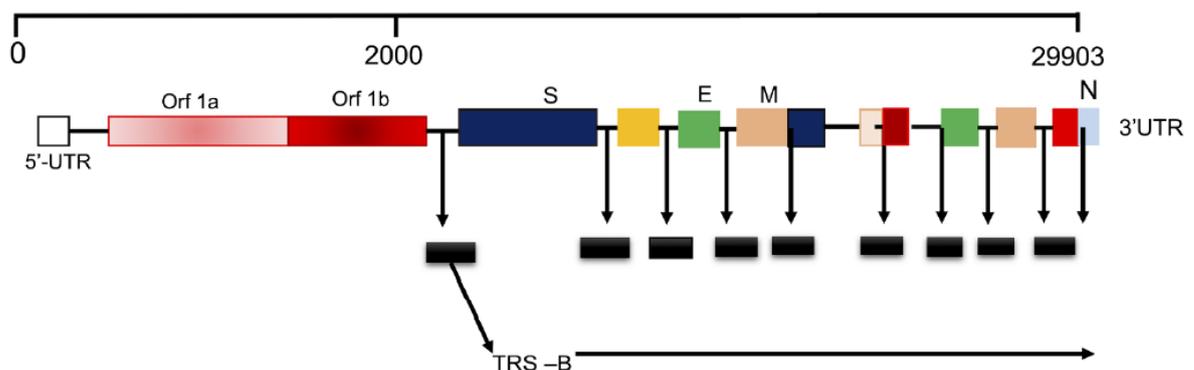


Abbildung 9: Schematische Darstellung des SARS-CoV-2 Genoms. Unverändert übernommen aus ^[27].

Die zwei UTRs sind wichtig für die RNA-RNA-Interaktion und Bindung der viralen und zellulären Proteine. Das *Spike*-Protein besitzt eine keulen-artige Form und spielt als Oberflächenprotein eine wichtige Rolle bei der Bindung an die Rezeptoren der Wirtszellen. Die *Spike*-Proteine sind in zwei Untereinheiten, die S1-Domäne und die S2-Domäne, aufgeteilt. Die S1-Domäne ist für die Rezeptorbindung und die S2-Domäne für die Fusion mit der Zellmembran verantwortlich.^[30] Im *Spike*-Protein befindet sich in der S1-Domäne die Rezeptor-Bindungsdomäne (RBD) und in der S2-Domäne die Heptad Repeat Region und Fusionspeptide.^[25] Als besonderes Charakteristikum enthält das *Spike*-Protein eine Aminosäuresequenz, bestehend aus PRRA (Pro-Arg-Arg-Ala), am Knotenpunkt der beiden Untereinheiten. Die basische Stelle ermöglicht eine effektive Spaltung durch Furin und andere Proteasen.^[29] Diese erleichterte Spaltung führt zu einer erhöhten Infektiosität, da sie den Kernpunkt zur Überwindung von Barrieren darstellt.^[25] Die Membran-Proteine sind in die Membran-Doppelschicht eingelagert und sind entscheidend für die Aufrechterhaltung der Form des Virions sowie die Knospung der viralen Komponenten (*budding*). Das E-Protein ist essentiell für die Pathogenese des Virus.^[27]

1.5.3 Replikation und Lebenszyklus

Der Lebenszyklus und die Replikation von SARS-CoV-2 sind analog zu der anderer Coronaviren und in Abbildung 10 veranschaulicht. Durch seine hohe Ähnlichkeit zum Genom von SARS-CoV-1 (79 % Identität) wird angenommen, dass das Virion mithilfe der *Spike*-Proteine an die hACE2-Rezeptoren (*human angiotensin-converting enzyme 2*) bindet. Nach der Adsorption folgt der Eintritt in die Zelle und die Fusion der viralen Membran mit der Zellmembran.^[31] SARS-CoV-2 kann über zwei Wege, den endosomal und nicht-endosomal, in die Zelle eintreten. Beim endosomal Weg in die Zelle bindet die S1-Domäne des *Spike*-Proteins an den ACE 2 Rezeptor und löst eine Konformationsänderung der S2-Domäne aus, die in einer Fusion mit der Zellmembran resultiert. Dieser Prozess wird durch die pH-abhängige Cysteinprotease Catheosin L ermöglicht. Bei dem nicht-endosomal Weg in die Zelle wird nach der Erkennung des *Spike*-Proteins durch den ACE 2 Rezeptor dieses durch eine Spaltung

der S1 und S2-Domäne aktiviert. Dafür sind die transmembrane Serinprotease 2 (TMPRSS2) und die TMPRSS11D verantwortlich.^[32] Die Fusion ist durch einen niedrigen pH-Wert begünstigt und es kommt zur Freisetzung der viralen RNA in das Zytoplasma. Die Translation der terminalen Polyproteine (pp1a und pp1b) wird initiiert und die Polyproteine werden autoproteolytisch in ihre Nichtstrukturproteine gespalten. (+)-RNA-Viren bilden aus einigen Nichtstrukturproteinen und der RNA-abhängigen RNA-Polymerase einen Replikase-Transkriptase-Komplex (RTC), der die Replikation und Transkription reguliert.^[31] Die virale Replikation erfolgt durch die Synthese eines negativ-orientierten Einzelstrangs, der als Vorlage zur Bildung des positiv-orientierten RNA-Genoms dient. Das neu synthetisierte genomische Material wird für die Translation weiterer Nichtstrukturproteine und RTCs genutzt oder in einem neuen Virion enkapsidiert.^[25] Strukturproteine und *accessory*-Proteine werden exprimiert und zum endoplasmatischen Retikulum gebracht. Das Nukleokapsid, das die genomische RNA enthält, wird gemeinsam mit den Strukturproteinen im Golgi-Apparat zusammengebaut (*Assembly*) und das neue Virion anschließend in einer Exozytose aus der Zelle geschleust.^[31] Die Funktion der Strukturproteine im Prozess des Zusammenbaus und der Knospung ist noch nicht genau geklärt.^[25]

1.5.4 Immunantwort

Verschiedenen Studien zufolge kommt es bei einer SARS-CoV-2 Infektion zu einem schwerwiegenden "Zytokin-Sturm" bei den Intensivpatienten. Infolge dieses "Zytokin-Sturms" erleiden die Patienten ein *acute respiratory distress syndrome* (ARDS), das eine Nachwirkung der kombinierten Immunantwort darstellt. Das Coronavirus aktiviert das angeborene und adaptive Immunsystem. Makrophagen werden durch die Entzündungssignale der Typ-2-Zellen freigesetzt, die wiederum Zytokine freisetzen. So werden mehr Immunzellen herbeigerufen. Die neutrophilen Granulozyten lösen die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS: *reactive oxygen species*) aus, die die infizierten Zellen zerstören. Zytokine verursachen eine Blutgefäßerweiterung, was zu einer Ansammlung von Blut und Flüssigkeit in der Lunge führen kann. Außerdem wird auch Interleukin-6 ausgeschüttet, was eine erhöhte Gefäßpermeabilität zur Folge hat. Die Hyperinflammation und der "Zytokin-Sturm" sind also verant-

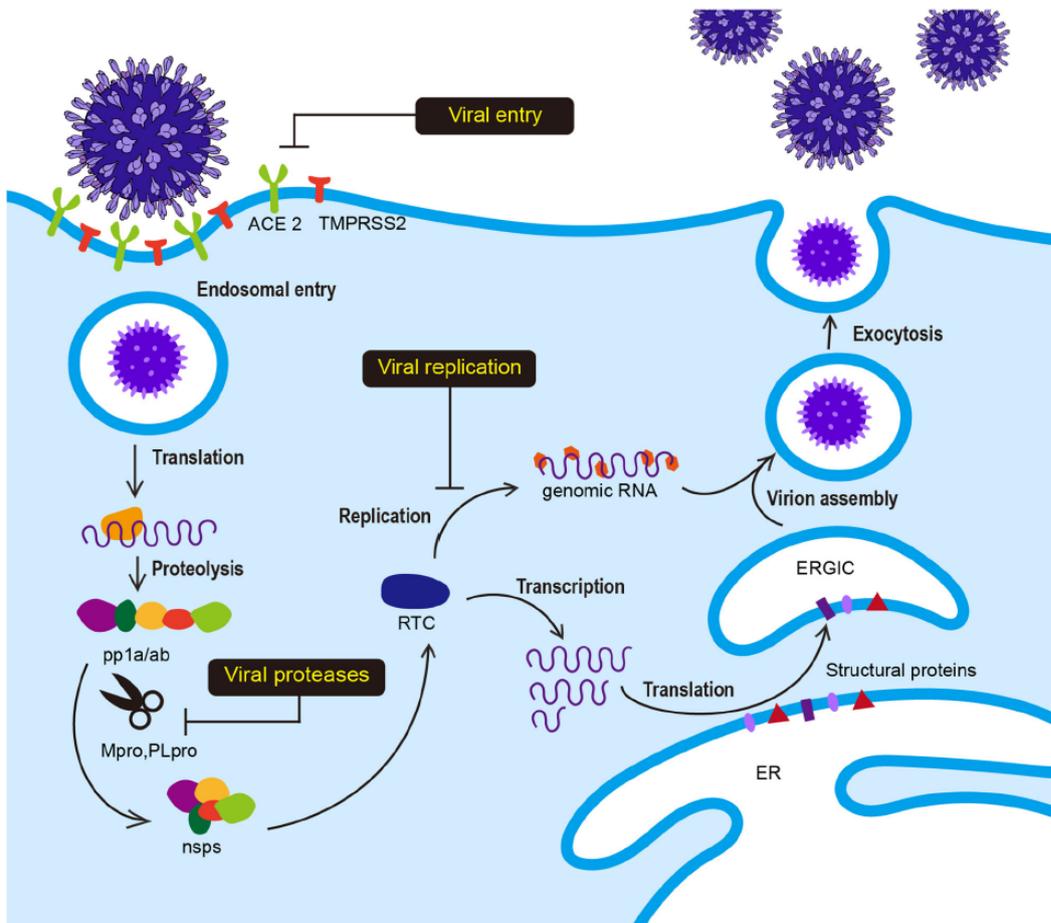


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Replikation des SARS-CoV-2 Virus. Zunächst erfolgt die Adsorption des Virions an die ACE-2 Rezeptoren. Das Virion wird durch eine Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen und es kommt zu einer Fusion der viralen Membran mit der Zelle. Die genomische RNA wird in der Zelle freigesetzt und translatiert. Es bildet sich der Replikase-Transkriptase-Komplex, der die Replikation und Translation reguliert. Nach der Zusammenführung der genomischen RNA und der Strukturproteine erfolgt die Knospung eines neuen Virions und dessen Freisetzung aus der Wirtszelle. Unverändert übernommen aus ^[31].

wortlich für ein ARDS und Multiorganversagen.^[24] Auch eine mukosale Immunantwort mit der Aktivierung des Immunglobulins A (IgA) und eine systematische Reaktion mit dem Immunglobulin G (IgG) folgt auf eine SARS-CoV-2 Infektion. Es wird vermutet, dass der obere Respirationstrakt hauptsächlich von IgA und der untere von IgG geschützt wird. Es konnte eine starke Reaktion der CD4+ T-Zellen auf die *Spike*-Proteine beobachtet werden, während die CD8+ T-Zellen weniger stark aktiviert wurden.^[33]

1.6 Coronavirus Disease (COVID19)

1.6.1 Übertragungswege

Die Übertragung von SARS-CoV-2 erfolgt hauptsächlich über Tröpfchen und Aerosole von Mensch zu Mensch. Andere Übertragungswege konnten bisher nicht nachgewiesen werden. Ein entscheidender Faktor für die hohe Infektionsrate ist, dass das Virus in den oberen Atemwegen repliziert wird. Darüber hinaus sind auch Infizierte, die keine Symptome ausbilden, ansteckend. Als Referenz kann die Reproduktionszahl (R_0) zu Rate gezogen werden. Diese wird für SARS-CoV-2 auf 2-3 geschätzt. Dieser Wert ist indes aufgrund der unterschiedlichen Grade der Infektiosität der Personen und wegen Superspreader schwer zu bestimmen. Die durchschnittliche Inkubationszeit liegt bei 5.7 Tagen und der Zeitraum, in dem 99 % der Infektionen erfolgen, bei 2-14 Tagen.^[34]

Als natürliches Reservoir des SARS-CoV-2 werden Fledermäuse vermutet. Es konnte eine sehr hohe Genom-Ähnlichkeit des SARS-CoV-2 von 96.2 % zum Coronavirus RaTG13, das aus Fledermäusen der Art *Rhinolophus affinis* in Yunnan isoliert wurde, und von 93.3 % zum Virus RmYN02, das ebenfalls in Fledermäusen der Art *Rhinolophus malayanus* entdeckt wurde, festgestellt werden. Das Auftreten dieser sehr ähnlichen Coronaviren in Fledermäusen stützt die Theorie, dass SARS-CoV-2 seinen Ursprung in Fledermäusen hat. Auch in Schuppentieren konnten Coronaviren mit einer hohen Ähnlichkeit identifiziert werden. So konnte in einem Erregerstamm in Guangdong eine Identität des Genoms von 92.4 % mit SARS-CoV-2 ermittelt werden. Bemerkenswert war, dass die Rezeptor-Bindungsdomäne sehr ähnlich ist und das Motiv nur in einer Aminosäure von der Sequenz des SARS-CoV-2 abweicht. Da die infizierten Schuppentiere jedoch auch Symptome aufwiesen, kann angenommen werden, dass sie nicht die natürlichen Reservoirs sind. Die bisherigen Erkenntnisse reichen noch nicht aus, um Schuppentiere als Zwischenwirte zu identifizieren, da eine direkte Verbindung zur SARS-CoV-2 Pandemie nicht nachgewiesen werden konnte. Zurzeit ist der Ursprung des SARS-CoV-2 noch nicht genau geklärt und es ist unklar, ob das Virus über einen Zwischenwirt auf den Menschen übertragen wurde.^[29]

1.6.2 Symptome

Die Symptome einer SARS-CoV-2 Erkrankung sind sehr unspezifisch und der Krankheitsverlauf kann von asymptomatisch bis hin zu schwer und sogar zum Tod führend variieren. Die häufigsten Symptome sind Fieber, Husten, Muskelschmerzen und Müdigkeit. Seltener sind Kopfschmerzen, Übelkeit, Hämoptyse (Bluthusten), produktiver Husten und Diarrhoe. Bei milden Verläufen treten nur leichtes Fieber und Müdigkeit auf, wohingegen schwere Fälle mit Dyspnoe, Lymphopenie, Hypalbuminämie und Pneumonie einhergehen können. Komplikationen traten in Form eines akuten respiratorischen Syndroms, akuter Herzschäden und sekundärer Infektionen auf.^{[28],[30]} Es kann auch zum Verlust der Geruchs- und Geschmackssinne kommen.^[29] Ein erhöhtes Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf besteht vor allem bei älteren Menschen und Menschen mit Vorerkrankungen wie Diabetes, arterielle Hypertonie und kardiovaskulären Erkrankungen. Die Intensivpatienten starben an einer schweren Pneumonie, Lungen- und Multiorganversagen.^[30] Ein erhöhtes Risiko tragen generell ältere Männer (≥ 60 Jahre), wohingegen bei Kindern und Schwangeren kein erhöhtes Risiko besteht.^[29]

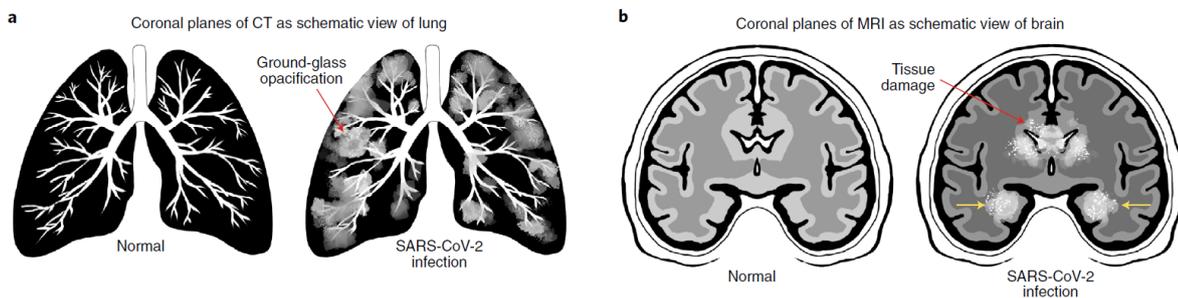


Abbildung 11: Vergleich einer gesunden Lunge und eines gesunden Gehirns mit denen eines Patienten mit einer SARS-CoV-2 Infektion. Schematische Darstellung einer CT und MRT. **a)** Trübungen in der Lunge (grau), **b)** Ränder der Lateralventrikel zeigen Aufhellungen an der betroffenen Hirnhaut auf (roter Pfeil). Der mediale Temporallappen zeigt ein hyperintenes Signal, was auf eine Entzündung hindeuten kann (gelber Pfeil). Leicht verändert übernommen aus ^[35].

Bei den Patienten trat das Phänomen der "weißen Lunge" auf (Abbildung 11). So konnten in CT Scans bilaterale, periphere Trübungen in der Lunge beobachtet werden. Bei Patienten im frühen Stadium konnten kleine Plaques und interstitielle Veränderungen festgestellt werden.^[30]

Die Pathogenese der SARS-CoV-2 Erkrankung ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass ein "Zytokin-Sturm" mit einem schweren Verlauf der Krankheit korreliert. Im Serum der Intensivpatienten konnte im Vergleich mit Nicht-Intensivpatienten eine deutlich höhere Konzentration an proinflammatorischen Zytokinen gemessen werden. Für ein besseres Verständnis sind weitere Studien zur Immunantwort auf eine SARS-CoV-2 Infektion notwendig.^[36]

1.6.3 Diagnose und Behandlung

Die Diagnose einer SARS-CoV-2 Infektion kann auf mehreren Wegen gestellt werden. Zur Verifizierung kann eine RT-PCR (*real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) oder ein Antigen-Schnelltest genutzt werden. Es können respiratorische Proben beispielsweise aus Nase, Rachen oder Speichel entnommen werden.^[30] Im Falle eines falsch-negativen Ergebnisses im PCR-Test kann ein CT Scan zu Rate gezogen werden, wenn ein starker Verdacht auf eine Infektion vorliegt.^[29]

Die allgemeine Behandlungsstrategie besteht in Bettruhe und unterstützenden Maßnahmen, wie einer antiviralen, immunmodulatorischen Therapie, der Verabreichung von Antibiotika, einer Dialyse, einer bronchoalveolären Lavage (BAL) oder einer extrakorporalen Membranoxygenierung (ECMO).^[28] Weltweit gilt die Empfehlung für die Ausübung eines guten Hygienekonzepts und Quarantänemaßnahmen sowie die Einhaltung von Abständen (*social distancing*), um die Übertragung des Virus zu verhindern.^[27] In Deutschland gibt es die AHA+A+L Regel, wobei AHA für Abstand (mind. 1.5 m) halten, Hygieneregeln (richtiges Husten, Niesen und gründliches Händewaschen) beachten und im Alltag das Tragen einer Maske steht. Das zusätzliche A weist auf die Nutzung der Corona-App hin und das L bedeutet "Lüften".^[37] Zur Eindämmung der Pandemie werden auch Schutzimpfungen empfohlen. Aktuell sind vier Impfstoffe mit den folgenden Wirksamkeiten und Impfabständen zugelassen:

Comirnaty®

von *BioNTech/Pfizer*: etwa 95 %, zwei Impfungen mit einem Impfabstand von 3-6 Wochen

Spikevax®

von *Moderna*: etwa 95 %, zwei Impfungen mit einem Impfabstand von 4-6 Wochen

Vaxzevria®

von *AstraZeneca*: bis zu 80 %, zwei Impfungen mit einem Impfabstand von 9-12 Wochen

Janssen®

von *Johnson & Johnson*: etwa 65 %, einmalige Impfung

Bei den ersten beiden handelt es sich um mRNA- und den letzten beiden um Vektorimpfstoffe. Die Schutzwirkung der Impfung tritt etwa 14 Tage nach der zweiten Impfdosis ein bzw. nach der ersten, wenn nur eine einzige Impfdosis nötig ist. Bei einem heterogenen Impfschema (1. Impfung mit Vaxzevria® von AstraZeneca /2. Impfung mit mRNA-Impfstoff) wird ein Impfabstand von 4 Wochen empfohlen.^[38] Grund für dieses heterogene Impfschema ist, dass seit der Einführung der Impfung mit Vaxzevria® (*AstraZeneca*) in seltenen Fällen Thrombosen bei Personen unter 60 Jahren auftraten und die STIKO (Ständige Impfkommission) aus diesem Grund am 1. April 2021 die Impfempfehlung bevorzugt für Menschen über 60 Jahren aussprach. Bei den anderen zugelassenen Impfstoffen kommt es meist zu einer Impfreaktion mit Schmerzen an der Einstichstelle, Müdigkeit und Kopfschmerzen.^[39]

1.6.4 Coronavirus Ausbrüche

Im 21. Jahrhundert kam es bereits zu drei großen Coronavirus-Ausbrüchen. Im Jahre 2002 hatte die durch SARS-CoV-1 ausgelöste Epidemie ihren Ursprung in Guangdong (China) und breitete sich in 29 Ländern mit 774 Opfern und 8096 bestätigten Infektionen aus. Zehn Jahre später kam es 2012 zu dem Ausbruch von MERS-CoV im mittleren Osten mit 2229 bestätigten Infektionen und 791 Todesfällen.^{[27],[36],[40]} Ende Dezember 2019 kam es erneut zu einem Ausbruch in Wuhan (China), der sich schnell über die Ländergrenzen hinweg ausbreitete, sodass die WHO am 11.03.2020 diesen durch SARS-CoV-2 ausgelösten Ausbruch zu einer Pandemie erklärte.^[36] Die bis heute wütende Pandemie forderte nach mehr als 1.5 Jahren

4 777 503 Opfer und 233 503 524 wurden infiziert (Stand: 01.10.2021).^[41] Eine Übersicht der globalen Ausmaße ist in Abbildung 12 zu sehen.

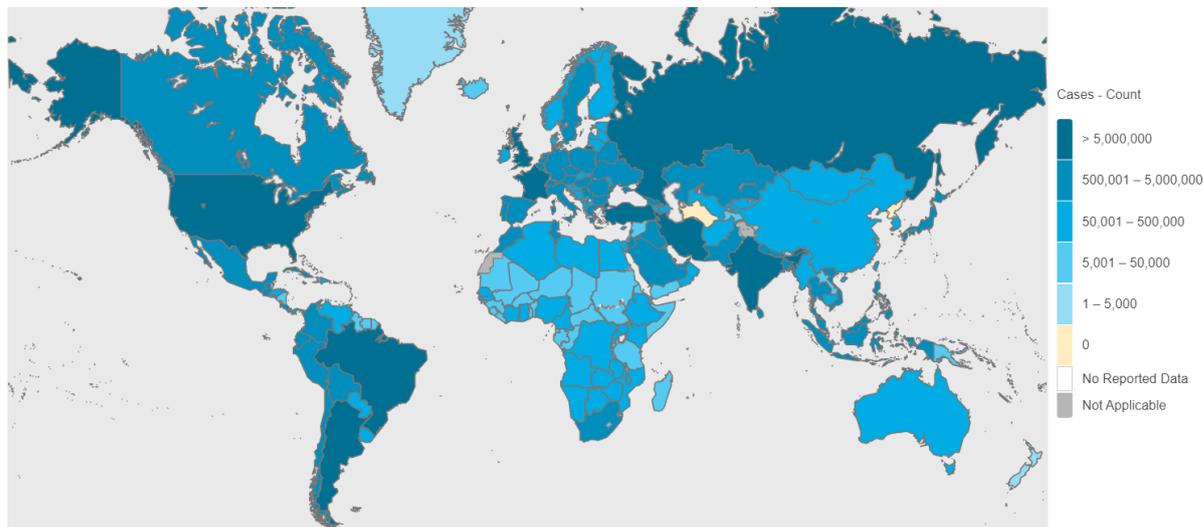


Abbildung 12: Pandemie durch SARS-CoV-2: Weltkarte mit Fallzahlen von der WHO (Stand: 01.10.2021). Übernommen und zusammengestellt aus dem Coronavirus Dashboard der WHO.^[41]

Die drei Corona-Ausbrüche der letzten Jahre wiesen deutliche Unterschiede in ihrer Mortalitätsrate und ihrem Infektionspotential auf (siehe Tabelle 2). Unter ihnen weist MERS-CoV die höchste Letalität und SARS-CoV-2 das höchste Infektionspotential auf, wobei die Werte aufgrund vieler asymptomatischer Infektionen schwer zu bestimmen sind. Gemeinsam haben sie jedoch ihren Ursprung in Fledermäusen als natürliches Reservoir und die Übertragung über Zwischenwirte auf den Menschen. Die Übertragung von Mensch zu Mensch war während der drei Ausbrüche unterschiedlich stark und ist durch die Reproduktionszahl R_0 definiert. Alle drei Coronaviren verursachen eine grippe-ähnliche Erkrankung.^{[36],[42]}

Tabelle 2: Vergleich von SARS-CoV-1, MERS-CoV und SARS-CoV-2. Verändert übernommen aus ^[42].

	SARS-CoV-1	MERS-CoV	SARS-CoV-2
Mortalitätsrate	9.5 %	34.4 %	2.5 % bzw. 6 % ^[36]
R_0	1.7-1.9	0.7	2.0-2.5 bzw. 2-3 ^[34]

Das Auftreten neuer Virusvarianten stellt zudem eine große Bedrohung dar, da die Wirksamkeit der Impfstoffe aufgrund von *Escape Mutations* nicht gewährleistet ist. Mutationen tauchen

in Viren auf, wenn ein Selektionsdruck besteht, und machen sie anpassungsfähiger.^[43] Zurzeit sind vier Varianten als besorgniserregend eingestuft (VOC: *variant of concern*), da sie in ihrer Übertragbarkeit, der Virulenz oder der Suszeptibilität gegenüber der Immunantwort von genesenen oder geimpften Personen von dem ursprünglichen Virus abweichen. Diese sind die B.1.1.7 (Alpha), B.1.351 (Beta), P.1 (Gamma) und B.1.617.2 (Delta) Varianten. Bei der erstmals im September 2020 in Großbritannien identifizierten Alpha-Variante liegt es eine entscheidende Mutation im S-Protein (N501Y) vor, die zu einer erhöhten Übertragbarkeit und vermutlich erhöhten Fallsterblichkeit in allen Altersgruppen führt. Eine verringerte Wirksamkeit der mRNA-Impfstoffe konnte jedoch nicht festgestellt werden. Die Beta-Variante wurde im Dezember 2020 in Südafrika entdeckt und wies eine verminderte Wirksamkeit der neutralisierenden Antikörper von Genesenen und Geimpften auf. Besorgniserregend ist eine erhöhte Anzahl an Mutationen, die in der Nähe der Rezeptor-Bindungsstelle liegen. Die im November in Brasilien entdeckte Gamma-Variante ähnelt der Beta-Variante, die eine erhöhte Übertragbarkeit aufweist. Die Delta-Variante trat zum ersten Mal im Oktober 2020 in Indien auf und ist durch ihre noch höhere Übertragbarkeit als die der Alpha-Variante und der verringerten Schutzwirkung der Impfstoffe besonders besorgniserregend. Nur die vollständige Impfung schützt bei dieser Variante nach vorläufigen Ergebnissen vor schweren Krankheitsverläufen. Sie besitzt zwei Mutationen im S-Protein (L452R, P681R).^{[43],[44],[45]} Neben den VOC gibt es zudem die VOI (*variant of interest*), die von Interesse sind, da sie mit einer erhöhten Übertragbarkeit und/oder veränderten Immunantwort assoziiert werden. Von der WHO werden zurzeit 7 Varianten beobachtet. In Deutschland stehen weitere sechs Varianten unter Beobachtung, da sie hier bereits auftraten, global aber kaum verbreitet sind.^[45]

In Anbetracht der wiederkehrenden Epidemien und Pandemien, die durch neue Coronaviren und ihre Virusmutationen verursacht werden, ist die Forschung und Entwicklung verschiedener Wirk- und Impfstoffe umso wichtiger für die Bekämpfung dieser und zukünftiger Ausbrüche. Dafür ist die Aufklärung der Ätiologie, Epidemiologie, Pathogenese des Virus und der pathologischen Immunantwort von großer Bedeutung, da bis heute vieles unklar ist.^{[29],[46]}

1.7 Ansatzpunkte zur Entwicklung von Wirkstoffen gegen den Coronavirus

Die Entwicklung der vier bisher zugelassenen Impfstoffe zur Behandlung von COVID19 innerhalb kürzester Zeit seit der ersten Entdeckung des Virus ist ein großer Erfolg in der Geschichte der Pharmazie. Bei der traditionellen Impfstoffentwicklung handelt es sich um einen sehr langen und kostenintensiven Prozess, der bis zu 15 Jahre oder länger dauern kann (Abbildung 13). Alleine der Prozess des Designs und der Evaluation potentieller Impfstoffe zieht sich über Jahre. Danach folgen die präklinische Phase und drei klinische Phasen, bevor ein Antrag auf Zulassung bei der FDA und EMA eingereicht werden kann. Erst mit der erteilten Zulassung kann die Produktion und Verteilung des Präparates beginnen. Bei der Forschung und Entwicklung des SARS-CoV-2 Impfstoffs konnten viele Schritte beschleunigt werden. Durch die aus der ursprünglichen Forschung und Entwicklung von Impfstoffen gegen SARS-CoV-1 und MERS-CoV gewonnenen Erkenntnisse konnten die ersten Schritte der Grundlagenforschung übersprungen und bereits existente Prozesse adaptiert werden. Darüber hinaus verliefen die klinischen Phasen sowie die Produktion von einigen vielversprechenden Impfstoffkandidaten parallel. Dadurch konnte die Impfstoffentwicklung deutlich auf etwa 1.5 Jahre verkürzt werden. Dieser beschleunigte Prozess birgt ein hohes finanzielles Risiko im Vergleich zur traditionellen Route.^[33]

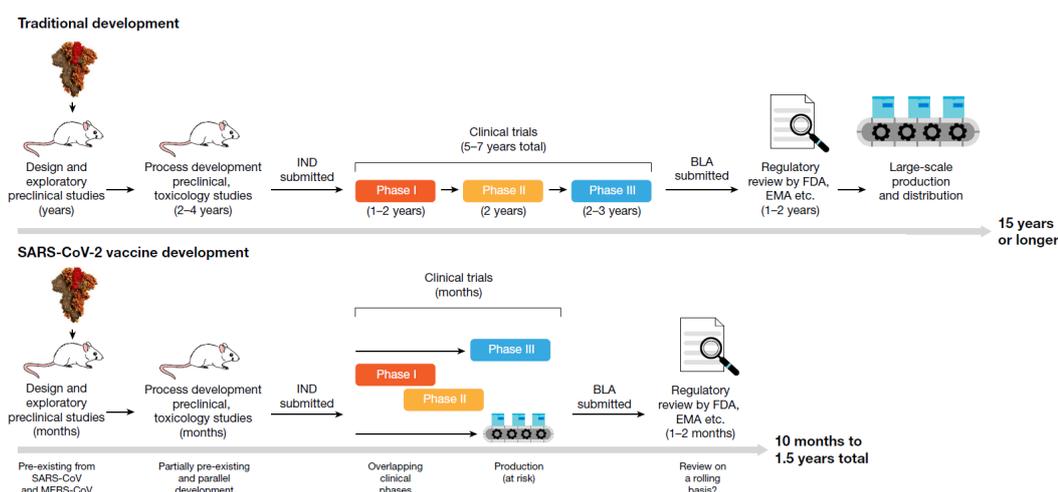


Abbildung 13: Vergleich der traditionellen und beschleunigten Impfstoffentwicklung. Leicht verändert übernommen aus^[33].

Nach Angaben der WHO sind über 180 Impfstoffkandidaten gegen SARS-CoV-2 in der Entwicklung. Davon befinden sich 184 Kandidaten in der präklinischen Phase und 107 in der klinischen Phase (Stand:09.07.2021). Dabei handelt es sich um unterschiedliche Arten von Impfstoffen^{[33],[47],[48],[49]}:

- DNA Impfstoff
- RNA Impfstoff
- Totimpfstoff
- Lebendimpfstoff
- Replizierender viraler Vektor
- Nicht-replizierender viraler Vektor
- Protein Untereinheiten
- Virus-ähnliche Partikel

DNA-Impfstoffe basieren auf Plasmid-DNA, die im großen Maßstab in Bakterien produziert wird. Meistens codieren diese Plasmide das *Spike*-Protein, das nach der Impfung im Körper exprimiert wird. Vorteilhaft ist die Möglichkeit der Produktion im großen Maßstab und die hohe Stabilität der DNA. Jedoch weisen DNA-Impfstoffe oft eine geringe Immunogenität auf. Bei den RNA-Impfstoffen handelt es sich um eine relativ neue Art von Impfstoffen, die aber Ähnlichkeiten zu den DNA-Impfstoffen besitzt. Dabei wird eine mRNA oder replizierende RNA verwendet, die das genetische Material für die Bildung des Antigens trägt und als Nanopartikel in die Zelle eingeschleust wird. Großer Vorteil ist hier auch die leichte und schnelle Produktion, da diese *in vitro* vorgenommen werden kann. Bei den Totimpfstoffen werden Viren in Zellkulturen gezüchtet und durch Hitze oder chemisch inaktiviert. Die Produktion ist einfach und wird nur durch die Produktivität der Zellkultur beschränkt. Der Vorteil bei der Verabreichung eines ganzen Virus ist, dass nicht nur das *Spike*-Protein adressiert wird, sondern eine Immunantwort auf alle Proteine (M,E,N) erfolgt. Schwierig ist lediglich die hohe Sicherheitsstufe von 3 bei der Produktion des inaktivierten Virus. Der Lebendimpfstoff enthält ein abgeschwächtes Virus, das bis zu einem bestimmtem Maß repliziert werden kann und eine Immunantwort auslöst, aber keine Krankheit verursacht. Die Schwächung des Virus erfolgt durch nicht günstige Bedingungen, wie eine zu niedrige Temperatur während des Wachstums oder eine rationale Modifikation, wie eine Deletion eines Gens. Auch hier ist der Aspekt der Sicherheit ein wichtiger Faktor. Bei den Impfstoffen, die auf rekombinanten Proteinen beruhen, können zwei Untereinheiten unterschieden werden: der *Spike*-Protein-basierte

und der RBD-basierte Impfstoff. Diese Proteine können in unterschiedlichen Systemen exprimiert werden und erfordern keinen Umgang mit aktiven Viren. Nachteil ist jedoch, dass die Expression von *Spike*-Proteinen relativ schwer ist.^[33] Darüber hinaus gibt es Impfstoffe, die auf Virus-ähnlichen Partikeln beruhen. Zum einen können sie nicht-pathogene Virus-ähnliche Nanopartikel beinhalten^[47], zum anderen handelt es sich um leere Virushüllen, die kein genetisches Material besitzen.^[48]

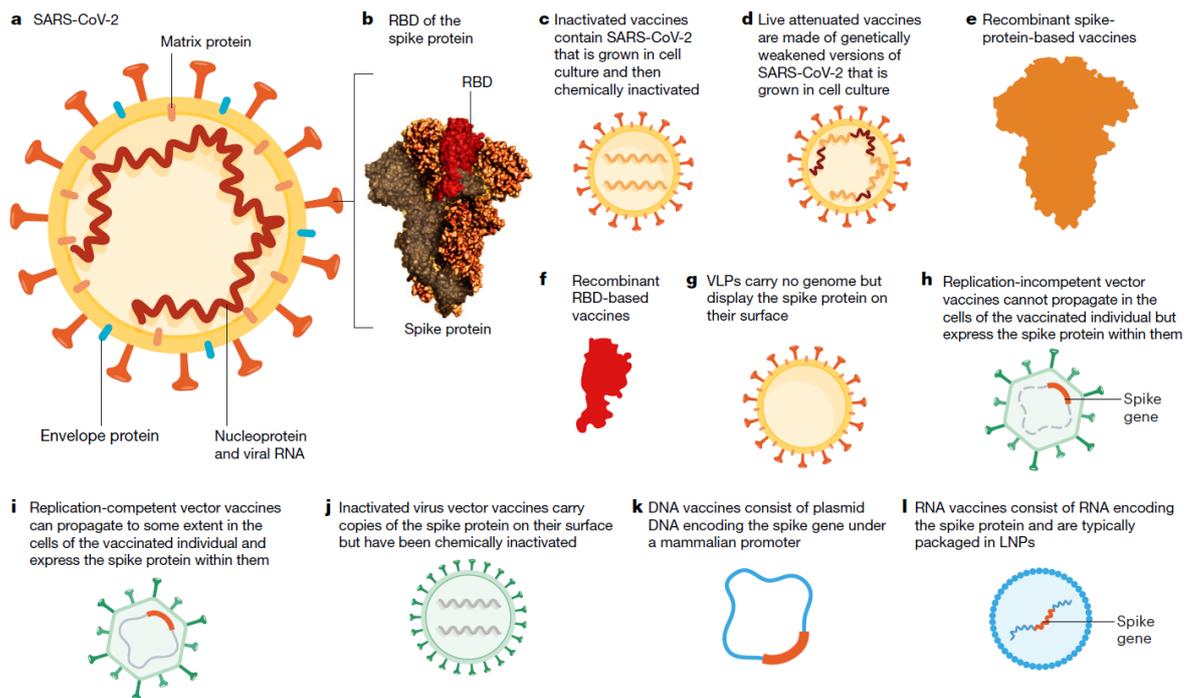


Abbildung 14: Verschiedene Therapieansätze zur Behandlung einer SARS-CoV-2 Erkrankung. a) SARS-CoV-2 Darstellung b) *Spike*-Protein mit RBD c) Totimpfstoff d) Lebendimpfstoff e) Impfstoff basierend auf dem rekombinanten *Spike*-Protein f) Impfstoff basierend auf der rekombinanten RBD g) Virus-ähnliche Partikel h) nicht-replizierender Vektor i) replizierender Vektor j) inaktivierter Virusvektor mit Oberflächen *Spike*-Proteinen k) DNA-Impfstoff l) RNA-Impfstoff. Unverändert übernommen aus^[33].

Replizierende Vektor-Impfstoffe werden aus Viren gewonnen, die genetisch modifiziert sind und Proteine des Coronavirus (meist das *Spike*-Protein) produzieren. Dabei handelt es sich um ein geschwächtes Virus, das innerhalb der Zelle noch repliziert wird. Dieser Impfstoff ruft eine starke Immunreaktion hervor und bewirkt so eine robuste Immunität. Bei den nicht-replizierenden Vektorimpfstoffen kann die Replikation innerhalb der Zelle nicht erfolgen. Sie

basieren auf anderen Viren (meist Adenoviren) und wurden modifiziert, sodass sie nur das *Spike*-Protein exprimieren. Bei der Produktion der Vektorimpfstoffe ist kein Umgang mit dem Lebendvirus notwendig und es besteht viel Know-How zur Produktion in großen Maßstäben. Der Impfstoff ruft eine gute Immunantwort der B- und T-Zellen hervor, wird aber durch eine etwaige Vorimmunität aufgrund anderer Vektorimpfstoffe nachteilig beeinflusst.^[33]

Neben den Impfstoffen wird intensiv an antiviralen Wirkstoffen geforscht. Es gibt verschiedene Ansätze für potentielle Hemmstoffe. Zum einen kann der Eintritt des Virus in die Wirtszelle gehemmt werden, indem potentielle Inhibitoren die Interaktion zwischen den *Spike*-Proteinen und ACE 2 Rezeptoren und somit die Membranfusion verhindern. Interessante Kandidaten, die noch untersucht werden, sind unter anderem Umifenovir (Arbidol), Camostat Mesylat, Chloroquin und Hydroxychloroquin. Zum anderen kann die Replikation gehemmt werden. Hier sind unter anderem Lopinavir und Ritonavir interessant, die die Cystein-Protease 3CL-pro (*3C-like protease*) inhibieren, und Remdesivir, Favipiravir und Ribavirin, die die RNA-abhängige RNA-Polymerase adressieren.^[29] Die Strukturen der genannten Wirkstoffkandidaten sind in Abbildung 15 gezeigt.

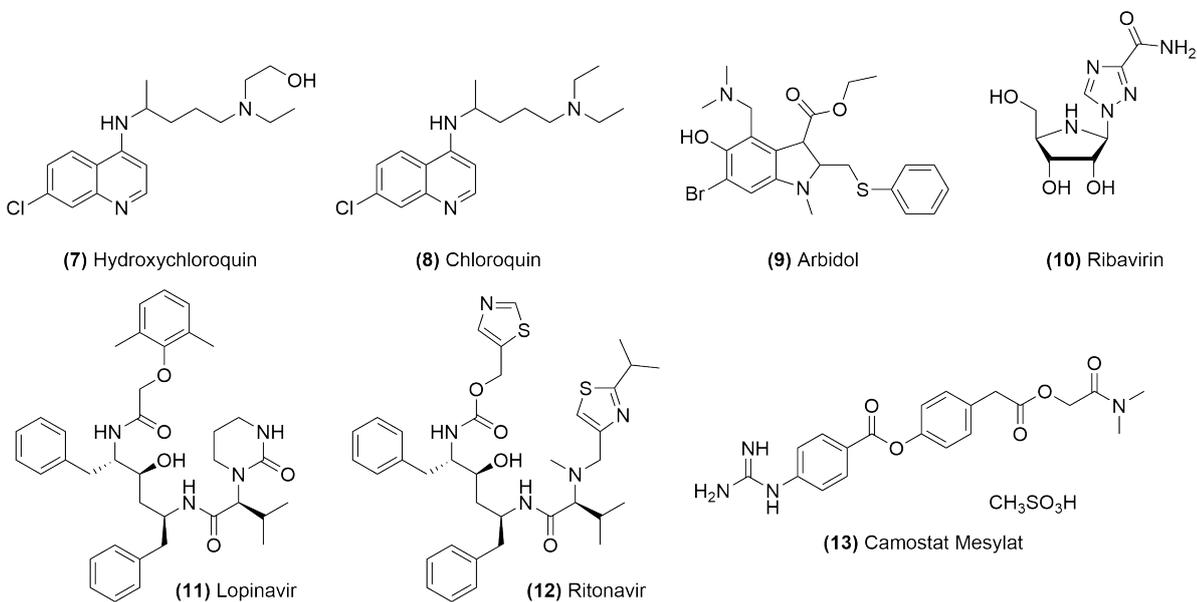


Abbildung 15: Strukturen potentieller antiviraler Wirkstoffe gegen SARS-CoV-2.^{[27],[50]}

Besonderes Augenmerk liegt auf Remdesivir, dessen Wirksamkeit in Kapitel 1.4 (S.13) ausführlicher beschrieben ist. Eine andere Möglichkeit der Therapie ist die Behandlung mit konvaleszentem Plasma. In vorläufigen Ergebnissen konnte eine Verbesserung des Zustands bei einer immunoglobulinen Therapie beobachtet werden. Durch *in vitro* und *in vivo* Studien konnte eine Wirksamkeit von monoklonalen Antikörpern festgestellt werden. Nachteile dieser Therapie sind jedoch ihre limitierte Verfügbarkeit und hohe Kosten.^[29]

1.8 Humane Helikase als Target in der antiviralen Wirkstoffentwicklung

Die humane DEAD-Box RNA-Helikase eIF4A (*eukaryotic initiation factor*) ist gemeinsam mit eIF4G und eIF4E Teil des heterotrimeren eIF4F-Komplexes. Dieser Komplex ist ein Hauptbestandteil der Cap-abhängigen Translation. Viren machen sich diese zelluläre Translationsmaschinerie des Wirtes für die Synthese ihrer eigenen viralen Proteine zu Nutze^[51] und haben Strategien entwickelt, um bevorzugt die Translation der viralen Proteine zu fördern.^[52]

Die Translation der mRNA in ihre codierenden Proteine kann in drei Phasen, die Initiation, Elongation und Termination, eingeteilt werden und ist vereinfacht in Abbildung 16 dargestellt. Bei der Initiation kann dabei die Cap-abhängige und Cap-unabhängige Initiation unterschieden werden.^{[51],[53]}

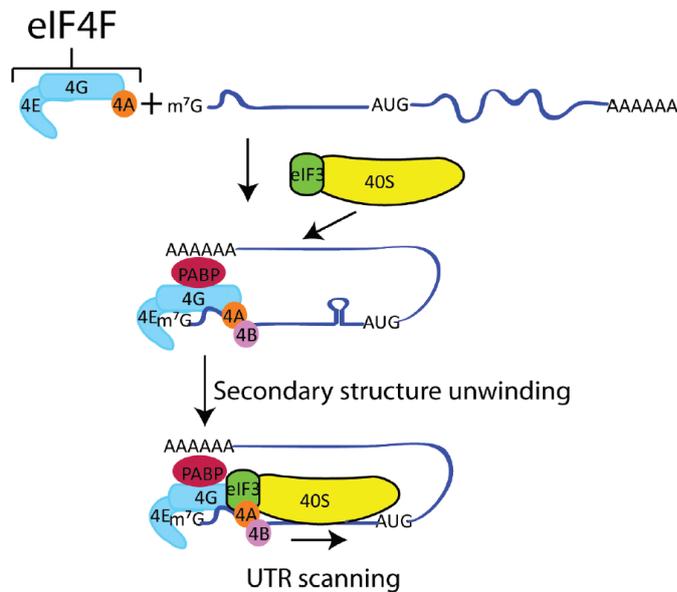


Abbildung 16: Vereinfachte Darstellung der eukaryotischen Translationsinitiation. Übernommen aus ^[53].

Bei Cap handelt es sich um ein Strukturelement am 5'-Ende der mRNA, das aus einem N⁷-Methylguanodin besteht und über eine Triphosphatgruppe mit der mRNA verknüpft ist.^[54] Bei der Cap-abhängigen Translation bindet der eIF4F-Komplex an das 5'-Ende der mRNA. In diesem Initiationsprozess ist eIF4E für die Bindung an die Cap-Struktur verantwortlich, eIF4A agiert als Helikase und das Gerüstprotein eIF4G interagiert mit dem Poly-A-Schwanz der

mRNA am 3'-Ende. Diese Interaktion fördert die Zyklisierung der mRNA. ^{[51],[53]} Darüber hinaus bindet der 43S-Komplex, bestehend aus der 40S Ribosom-Untereinheit, dem Initiationsfaktor eIF3 und einem ternären Komplex (eIF2, GTP, Met-tRNA_i), über den eIF3 an eIF4G und scannt die 5'-UTR der mRNA nach dem Startcodon. eIF4A entwindet die Sekundärstruktur der 5'-UTR der mRNA. Diese Helikaseaktivität wird durch eIF4B verstärkt und ermöglicht erst das Screening durch den 43S-Komplex. Nachdem das Startcodon identifiziert wird, wird die 60S Ribosom-Untereinheit rekrutiert und es bildet sich das vollständige Ribosom für die anschließende Elongation. ^[53] Die Entwindung der Sekundärstruktur der mRNA durch eIF4A spielt auch bei der Cap-unabhängigen Translation via IRES bei manchen viralen Infektionen eine Rolle. Trotz der bedeutenden Funktion von eIF4A während der Translation gibt es nur wenige Informationen über dessen Funktion bei viralen Infektionen. ^[51] Die DEAD-Box Helikase eIF4A kann bei Säugetieren in eIF4A1, die essentiell für die Zellviabilität ist, die nicht-essentielle eIF4A2 und eIF4A3 unterteilt werden. EIF4A1 und eIF4A2 weisen eine hohe Sequenzidentität von 90-95 % auf und können beide Teil des eIF4F-Komplexes sein, während eIF4A3 nur eine Ähnlichkeit von etwa 60 % besitzt und in dem Splicing-Prozess der prä-mRNA involviert ist. Charakteristisch ist ihre Aminosäure-Sequenz bestehend aus Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD). ^{[52],[55]}

Antivirale Wirkstoffe können entweder virale oder wirtseigene Targets haben. Bei den viralen Targets adressierenden Wirkstoffen handelt es sich um Hemmstoffe, die zum Beispiel den Eintritt in die Zelle, die Fusion oder die Reifung von Virionen verhindern. Nachteil dieser virusspezifischen Hemmstoffe ist, dass sie erst mit einem viralen Ausbruch entwickelt werden und Viren durch Mutationen dem Selektionsdruck entfliehen können. Bei der Hemmung von wirtseigenen Proteinen besteht diese Gefahr nicht. Jedoch geht diese Strategie mit Nebenwirkungen in normalen Prozessen der Zelle einher. Die Hemmung von wirtseigenen Proteinen, die an der Translation beteiligt sind und auf die die Translation der viralen Proteine angewiesen sind, ist ein vielversprechender Ansatz, der eine breit gefächerte Anwendung gegen verschiedene Viren ermöglicht. ^[52] Die entscheidende Rolle von eIF4A bei der Translation und die Notwendigkeit des zellulären Proteinsynthese-Apparats für die virale Translation machen die Helikase als wirtseigenes Target mit einer breiten Anwendungsmöglichkeit zu einem

interessanten Ziel für die Entwicklung von antiviralen Wirkstoffen.

1.8.1 Small molecules als eIF4A-Inhibitoren

Small molecules, wie Hippuristanol, Pateamin A, Etalol, Elisabatin A, 15d- Δ -Prostaglandin-J2, Sanguinarin, 6- α -Aminocholestanol,^[55] Allolaurinterol^[52] und einige Rocaglate (Abbildung 17), sind bekannte eIF4A-Inhibitoren. Alle Inhibitoren weisen unterschiedliche Hemmmechanismen auf. So bindet Hippuristanol an die C-terminale Domäne, stabilisiert eIF4A in seiner geschlossenen Form und verhindert somit die RNA-Interaktion. Pateamin A und die Rocaglate stabilisieren den RNA-eIF4A-Komplex und senken so die Verfügbarkeit von eIF4A für den eIF4F-Komplex. Allolaurinterol, Etalol und Elisabetin A hemmen *in vitro* die ATPase Aktivität, die durch eIF4A vermittelt wird.^{[55],[56]} Bei Prostaglandin wird vermutet, dass die Hemmung durch eine Störung der Interaktion von eIF4A mit eIF4G hervorgerufen wird. Basierend auf *in vitro* Testungen wird angenommen, dass 6- α -Aminocholestanol die ATPase und Helikase Aktivität hemmt. Das Sanguinarin weist den gleichen Hemmmechanismus auf.^[55]

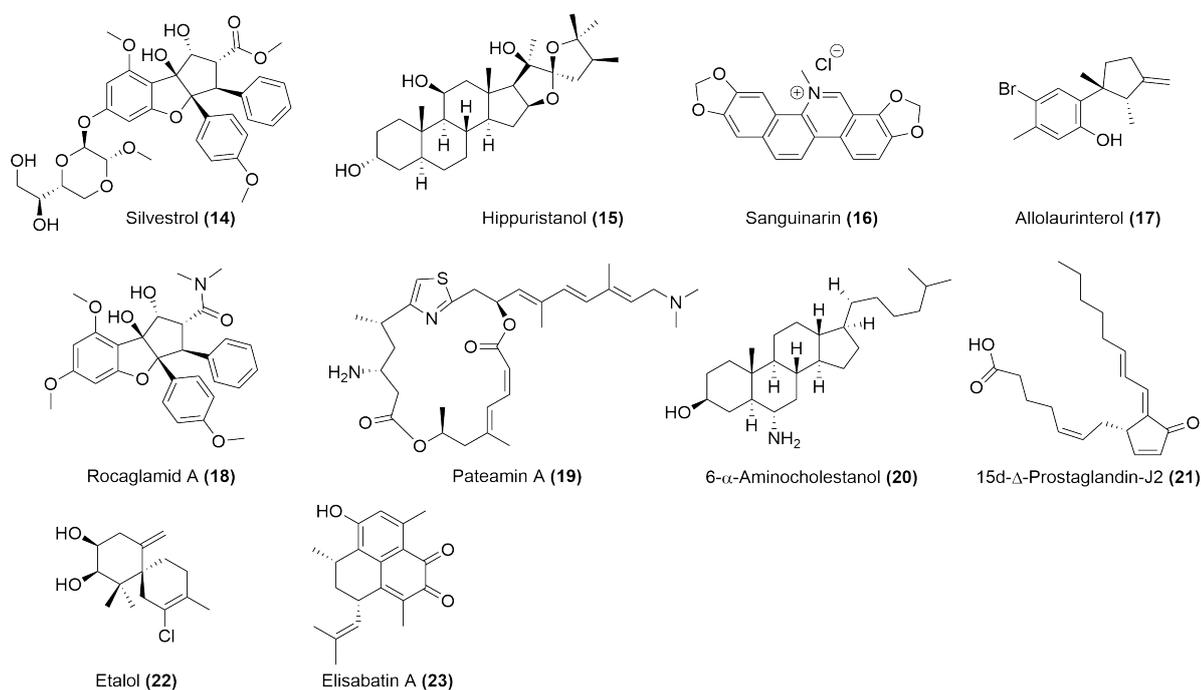


Abbildung 17: Bekannte eIF4A-Inhibitoren. Strukturen übernommen aus ^{[52],[55]}.

Für diese Arbeit sind Rocaglate von besonderer Bedeutung, weil sie insofern als Vorbilder dienen als durch die zu entwickelnden synthetischen Hemmstoffe weitgehend dieselben intermolekularen Wechselwirkungen adressiert werden sollen und ihre Wirkung letztendlich den Zielpunkt der Entwicklung definiert. Charakteristisch für die Rocaglate ist ihre Cyclopenta[*b*]benzofuran Struktur. Die Hemmung von eIF4A durch RocA beruht auf einem Festklammern des RNA-Helikase-Komplexes (*RNA clamping*), was in Kapitel 3.8 (S.80) genauer beschrieben wird. Auch für Silvestrol, ein Naturstoff gewonnen aus dem asiatischen Mahagoniegewächs der Gattung *Aglaia*, wird ein ähnlicher Mechanismus via *in silico* Docking vermutet. Dieses besitzt im Vergleich zu dem ersten isolierten Rocaglat, Rocaglamid A (RocA), einen zusätzlichen Dioxanring. Als bekannter eIF4A-Inhibitor zeigt Silvestrol Wirkung gegen ein breites Spektrum von RNA-Viren, wie zum Beispiel das Ebolavirus (EBOV), verschiedene Coronaviren, das Hepatitis E Virus, das Zika-Virus oder Picornaviren. Rocaglate wurden ursprünglich als Wirkstoffe für die Tumorforschung untersucht, denn sie weisen neben der antiviralen auch eine anti-tumorale Wirkung auf. Das Potential der Rocaglate als antivirale Wirkstoffe spiegelt sich in der Zulassung von Zotatfin (eFT226) für die klinische Phase wider.^[52]

2 Aufgabenstellung und Motivation

In Anbetracht der immer neu auftretenden, von Viren verursachten Ausbrüche besteht die Notwendigkeit eines antiviralen Wirkstoffs mit einem breiten Wirkungsspektrum. Umso dringender wird diese Notlage, wenn die Welt einer Pandemie wie der zurzeit wütenden von SARS-CoV-2^[36] oder wie im Jahr 2014 dem großen Ebola-Ausbruch in West-Afrika^[8] gegenüber steht. Bis heute gibt es auf mehr als 220 bekannte humanpathogene Viren lediglich zehn klinisch zugelassene antivirale Wirkstoffe.^[21] Neben Impfungen als prophylaktische Maßnahme zur Reduzierung der Übertragung sind antivirale Wirkstoffe als Behandlungsmethode zur Reduktion der Mortalität von bereits Infizierten ein wichtiges Instrument zur Eindämmung von Pandemien.^[57] Silvestrol ist als antiviraler Wirkstoff sehr interessant, da es als eIF4A-Inhibitor breite Anwendung gegen verschiedene RNA-Viren findet.^[52] Durch seine komplexe Struktur ist eine synthetische Herstellung über 17 Stufen für das Rocglamid^[58] und acht Stufen für den Dioxanring^[59] jedoch sehr aufwendig (Abbildung 18). Deshalb ist die Entwicklung kleinerer Moleküle, die Wirkstoff-ähnlicher sind und die Bindetasche des eIF4A-RNA-Komplexes adressieren, umso bedeutender für die Bekämpfung künftiger Pandemien.

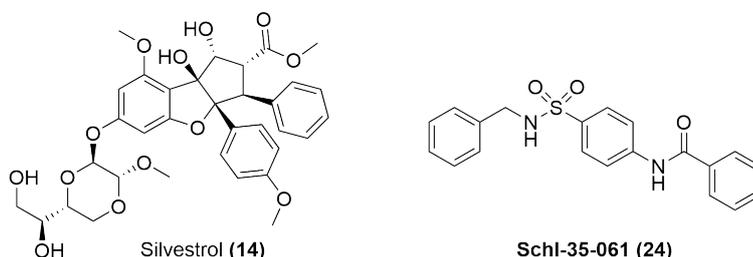


Abbildung 18: Struktur von Silvestrol und dem linearen Sulfonamid **Schl-35-061**.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung neuartiger, potentieller eIF4A-Inhibitoren. Mithilfe eines Liganden- und Struktur-basierten Designs sollten Substanzen identifiziert werden, die die eIF4A-spezifische Translation hemmen. Der Ausgangspunkt für das Liganden-basierte Design war die in der Masterarbeit von P. MENZEL (AK Schlitzer) dargestellte Verbindung **Schl-35-061** (Abbildung 18). Dabei handelt es sich um ein lineares Sulfonamid mit einem unspezifischen inhibitorischen Effekt auf die Translation von 50 % bei einer Konzentration von 5 μM .^[60] Basierend darauf sollten verschiedene Modifikationen zur Verbesserung der

Hemmwirkung dieser Ausgangsverbindung durchgeführt werden (Abbildung 19a). Darüber hinaus sollten in dieser Arbeit weitere Stoffklassen, wie die propellerartige Sulfonamide (Abbildung 19b) und Carbonsäureamide (Abbildung 19c), die DIELS-ALDER-Addukte (Abbildung 19d) und die Rhodanine (Abbildung 19e), untersucht werden.

Bei dem Struktur-basierten Ansatz handelt es sich um ein *de novo* Design kleiner Moleküle, die die Bindetasche der humanen Helikase eIF4A im Komplex mit einer Polypurin-reichen RNA (PDB:5ZC9)^[66] adressieren. Eine wichtige Anforderung an die Zielstrukturen sollte die gute Ausfüllung der Bindetasche sein. Zudem sollten die elektronischen Eigenschaften der Zielstrukturen komplementär zu den in der Bindetasche vorherrschenden elektronischen Eigenschaften sein. Im Rahmen dessen sollten *N*-Acylaminosäureamide (Abbildung 19f) mit verschiedenen Modifikationen synthetisiert werden. Die verzweigten Sulfonamide (Abbildung 19g) sollten nach der Anwendung des Struktur-basierten Designs auf die Stoffklasse der linearen Sulfonamide dargestellt werden.

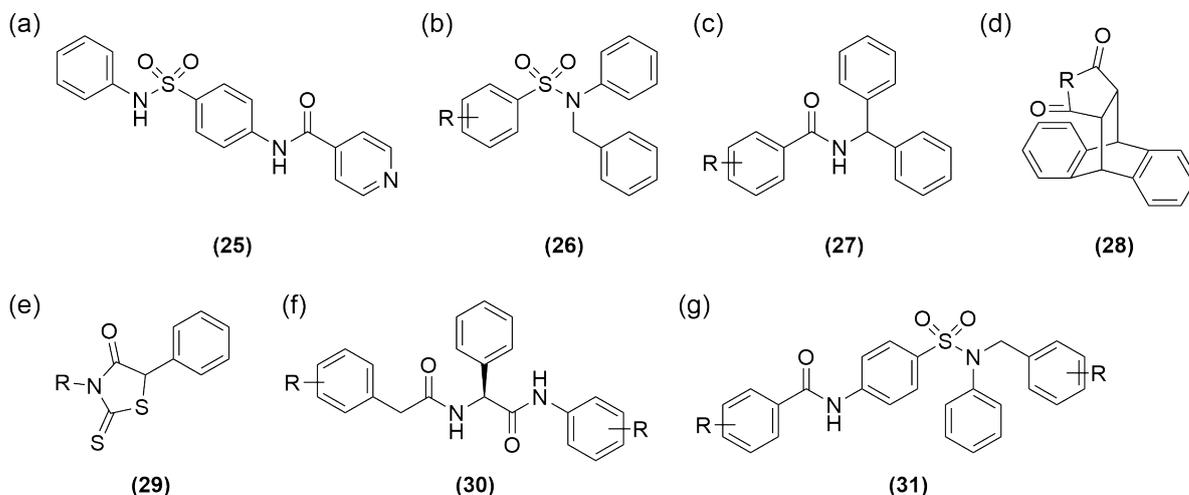


Abbildung 19: Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten Stoffklassen: (a) Lineare Sulfonamide (b) Propellerartige Sulfonamide (c) Propellerartige Carbonsäureamide (d) DIELS-ALDER-Addukte (e) Rhodanine (f) *N*-Acylaminosäureamide (g) Verzweigte Sulfonamide.

Alle synthetisierten Verbindungen sollten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe GRÜNWELLER auf ihre Hemmung der Helikase untersucht werden. Dabei wurden ein WST-1-Assay (*water soluble tetrazolium*) zur Bestimmung der Zytotoxizität und *Dual-Luciferase-Assays* (DLA) oder *Thermal Shift Assays* (TSA) zur Untersuchung der Hemmwirkung durchgeführt. Sollte in diesen biologischen Testungen eine spezifische Hemmwirkung festgestellt werden, sollten die entsprechenden Verbindungen in der Arbeitsgruppe ZIEBUHR auf ihren antiviralen Effekt gegen Coronaviren untersucht werden. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe WEBER sollten zudem einige Verbindungen auf ihren antiviralen Effekt gegen dem *Rift-Valley-Fever-Virus* (RVFV) getestet werden. Als Nebenprojekt sollten ausgewählte Verbindungen in Kooperation mit der Arbeitsgruppe GREVELDING auf ihre anthelminthische Wirkung gegenüber adulten *Schistosoma mansoni* Paaren untersucht werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

Der Fokus dieser Dissertation lag in der Entwicklung verschiedener Substanzklassen, die als potentielle eIF4A-Inhibitoren wirken sollten. Die biologischen Testungen wurden von Dr. WIEBKE OBERMANN (Arbeitskreis GRÜNWELLER, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt.

3.1 Liganden-basiertes Design

Bei der Liganden-basierten Wirkstoffentwicklung dienen bereits bekannte Liganden des Zielproteins als Grundlage für das Design von Molekülen mit ähnlichen geometrischen und elektronischen Eigenschaften. Nach der Synthese erfolgt die biologische Testung der entsprechenden Moleküle. Im Rahmen der Masterarbeit von PATRICK MENZEL (Arbeitskreis SCHLITZER, Philipps-Universität Marburg) konnte in Kooperation mit Dr. ALEXANDER METZ (Arbeitskreis KLEBE, Philipps-Universität Marburg) aus einer ZINC-Datenbank von 100 Molekülen ein Sulfonamid (**32**) (Abbildung 20) identifiziert werden, welches eine hohe Ähnlichkeit zum Silvestrol aufwies und synthetisch leicht zugänglich war. Dieses Molekül (**32**) wurde weiter modifiziert, sodass Verbindung (**24**) (Abbildung 20) mit einem inhibitorischen Effekt von 50 % auf die Translation bei 5 μM erhalten wurde.^[60] Diese Verbindung diente als Ausgangspunkt für das Liganden-basierte Design der linearen Sulfonamide dieser Dissertation (Abbildung 20).

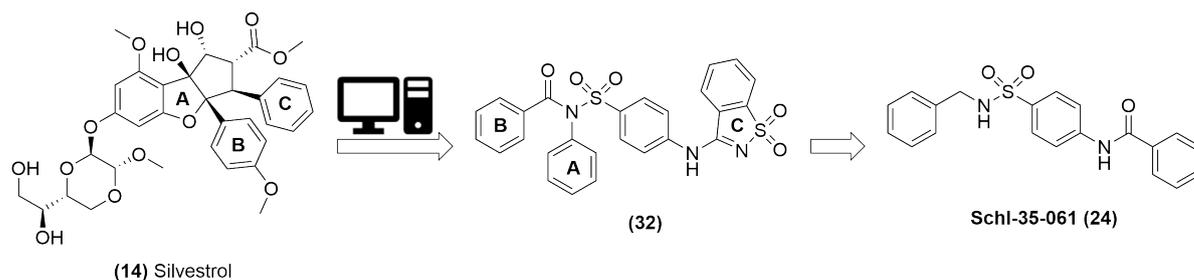


Abbildung 20: Ausgangspunkt der Dissertation mit einem Liganden-basierten Ansatz aus der Masterarbeit von P. MENZEL. Nach einem Screening einer ZINC-Datenbank wurde Verbindung (32) als Ligand mit einer großen Ähnlichkeit zu Silvestrol identifiziert und nach weiteren Modifikationen zu dem Sulfonamid (24) mit einem inhibitorischen Effekt von 50 % auf die Translation bei 5 μM optimiert.^[60]

3.2 Biologische Testungen neuer potentieller eIF4A-Inhibitoren

Die biologischen Testungen der neuen potentiellen eIF4A-Inhibitoren, die im Rahmen dieser Arbeit mithilfe des Liganden- und Struktur-basierten Designs synthetisiert wurden, wurden im Arbeitskreis GRÜNWELLER (Philipps-Universität Marburg) von Dr. WIEBKE OBERMANN und ihren Masteranden durchgeführt. Als Erstes wurde ein WST-1-Assay (*water soluble tetrazolium*-Assay) zur Bestimmung der Zytotoxizität der Substanzen in HepG2-Zellen durchgeführt. Hierbei wurde die Proliferation nach 48 h bei Konzentrationen von 10 μM und 100 μM bestimmt. War die Verbindung bei diesen Konzentrationen zytotoxisch, wurden niedrigere Konzentrationen von 1 μM und 100 nM gewählt. Die Verbindungen wurden anschließend bei der nicht zytotoxischen Konzentration im DLA (*Dual-Luciferase*-Assay) untersucht. Im Laufe der Promotion wurden die Verbindungen, die bei Konzentrationen von 10 μM und 100 μM nicht zytotoxisch waren, anschließend nicht mehr im DLA getestet, da nach den bis zu diesem Zeitpunkt gesammelten Erfahrungen keine Hemmung der Translationseffizienz zu erwarten war. Ein CC_{50} -Wert (50 % Zytotoxische Konzentration) konnte nicht bestimmt werden, weil dies aufgrund der Vielzahl der zu testenden Verbindungen einen nicht zu leistenden Aufwand erfordert hätte. Bei der höchsten nicht-toxischen Konzentration wurden die Verbindungen im DLA auf ihre inhibitorische Wirkung bezüglich der Translation untersucht. Als Negativkontrolle wurde β -Globin und als Positivkontrolle PIM1 oder die Polypurin-Sequenz (AG)₁₅ verwendet. Ein selektiver eIF4A-Inhibitor sollte im DLA keine Wirkung auf die Translationseffizienz von β -Globin zeigen und nur die Translationseffizienz der Positivkontrolle herunter regulieren. Abbildung 21 zeigt diese gewünschte Hemmung sowie einen unspezifischen inhibitorischen Effekt, bei dem beide Parameter herunter reguliert sind. Ist die Translationseffizienz beider Parameter nicht beeinflusst, liegt kein inhibitorischer Effekt vor.

Neben dem DLA wurde im Laufe der Zeit auch ein *Thermal-Shift-Assay* (TSA) zur biologischen Evaluation eingeführt. Der TSA wurde jedoch nicht für alle Verbindungen durchgeführt. Dieser dient zum Nachweis einer Bindung der zu testenden Verbindung an den eIF4A-RNA-Komplex. Bei diesem Assay handelt es sich um einen weniger arbeits- und zeitaufwändigen Test, der sich folglich für das Screening einer größeren Anzahl an Substanzen eignet.^[61] Bei ei-

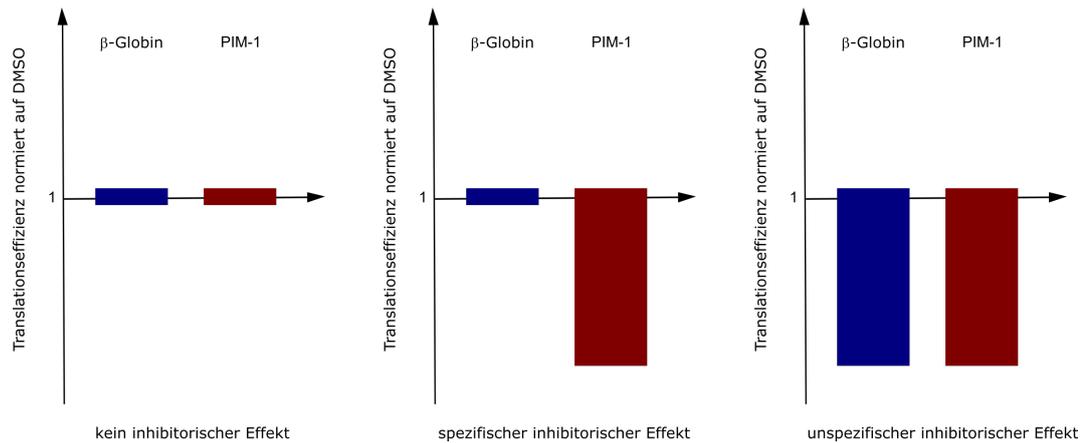


Abbildung 21: Schematische Darstellung der möglichen Ergebnisse eines DLA. In Anlehnung an [63]

ner Stabilisierung des Proteins durch die Bindung eines Liganden kann eine erhöhte Schmelztemperatur gemessen und somit eine thermische Verschiebung ermittelt werden.^[62] Bei Silvestrol konnte eine Erhöhung des Schmelzpunktes von über 8 °C beobachtet werden.^[64] Weil die Wahrscheinlichkeit, eine ähnlich wirksame Verbindung zu finden, eher gering ist, kann folglich angenommen werden, dass für die in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen bereits eine Temperaturerhöhung von 1 °C im TSA als signifikant erachtet werden kann. Alle synthetisierten Verbindungen wurden bei einer Konzentration von 100 μ M im TSA getestet. Als Negativkontrolle diente DMSO und als Positivkontrolle CR-31-B (rac), ein synthetisches Silvestrol-Analogon mit einer vergleichbaren Aktivität.^[64]

3.3 Lineare Sulfonamide

3.3.1 Motivation und Idee

Die Stoffklasse der Sulfonamide basiert auf den Ergebnissen der Masterarbeit von PATRICK MENZEL (Arbeitskreis Schlitzer, Philipps-Universität Marburg). Im Rahmen seiner Arbeit zeigte die Verbindung **Schl-35-061** in den biologischen Tests einen inhibitorischen Effekt von über 50 % auf die Translation bei 5 μ M und konnte daher als vielversprechender Ausgangspunkt für weitere Modifikationen identifiziert werden. PATRICK MENZEL hatte in seiner Masterarbeit bereits ein paar Modifikationen vorgenommen.^[60] In Abbildung 22 sind die daraus abgeleiteten Struktur-Wirkungsbeziehungen zusammengefasst.

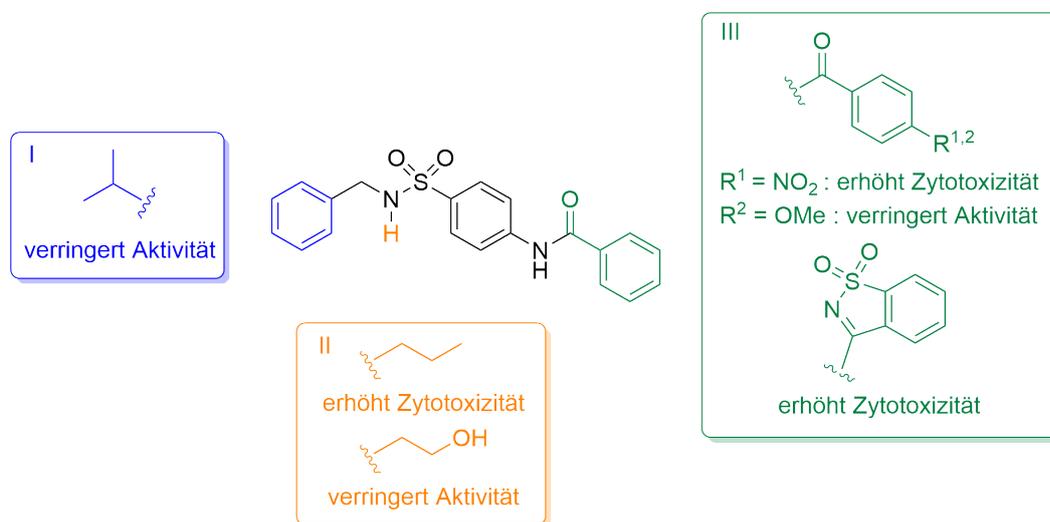


Abbildung 22: Erste SAR der linearen Sulfonamide^[60].

Aus den biologischen Ergebnissen konnte abgeleitet werden, dass der Benzylrest im Strukturelement I für die inhibitorische Wirkung notwendig war und die Einführung einer aliphatischen Kette am Sulfonamid-Stickstoff die Aktivität verringerte bzw. die Zytotoxizität erhöhte. Auch die Modifikation des Benzoylrests sowie der Austausch durch einen Saccharin-Rest führten zu einer verringerten Aktivität bzw. erhöhten Zytotoxizität.^[60]

Dies stellte den Anknüpfungspunkt dieser Dissertation dar. Zunächst bestand die Möglichkeit die Strukturelemente I und III durch die Einführung verschiedener Substituenten mit unterschiedlichen elektronischen Eigenschaften zu modifizieren. Bei dem Strukturelement I besteht zudem die Möglichkeit, die den Abstand zwischen Alkylrest und Sulfonamid-Stickstoff zu variieren. Ein weiterer Aspekt war die Prüfung der Notwendigkeit der in **Schl-35-061** genutzten funktionellen Gruppen, nämlich des Sulfonamids sowie des Carbonsäureamids. In Abbildung 23 sind die hier vorgenommenen Modifikationen an der Stoffklasse der linearen Sulfonamide zusammengefasst.

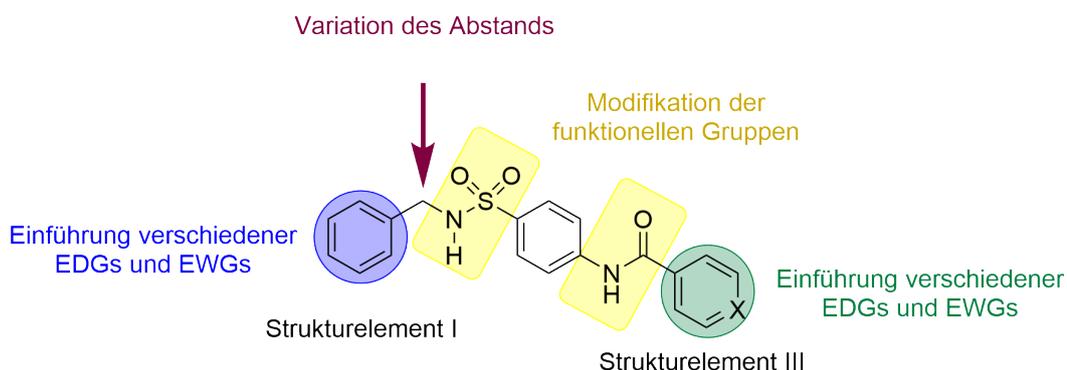
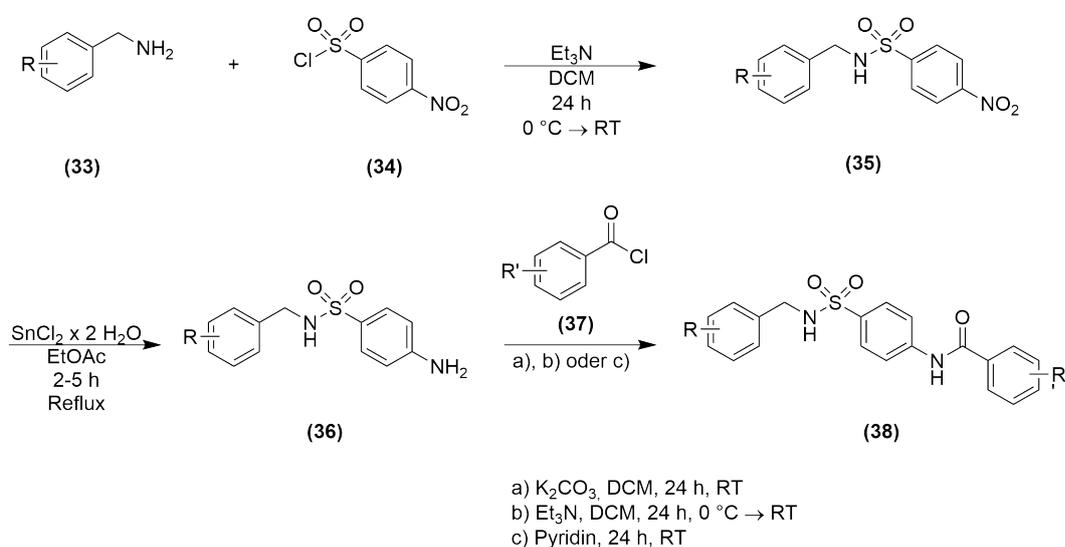


Abbildung 23: Alle in dieser Arbeit durchgeführten Modifikationen an der Stoffklasse der linearen Sulfonamide. Es sollten Modifikationen an den funktionellen Gruppen vorgenommen werden (gelb). Darüber hinaus sollte der Abstand zwischen Alkylrest und Sulfonamid-Stickstoff variiert werden (dunkelrot). Im Strukturelement I (blau) und Strukturelement III (grün) sollten verschiedene EDGs und EWGs eingeführt werden.

3.3.2 Synthese und biologische Testungen der linearen Sulfonamide

Die Darstellung der linearen Sulfonamide erfolgte nach einer dreistufigen Synthese wie in der Masterarbeit von P. MENZEL beschrieben.^[60] Zuerst wurden 4-Nitrobenzensulfonylchlorid (**34**) und das entsprechende Amin (**33**) in einer nucleophilen Substitution mit Triethylamin als Base umgesetzt. Anschließend wurde die Nitrogruppe des Sulfonamids (**35**) mithilfe von Zinn(II)-chlorid zum Amin (**36**) reduziert. Im letzten Schritt konnten die Zielverbindungen (**37**) durch eine weitere nucleophile Substitution erhalten werden. Hierbei wurden abhängig von der Zielverbindung drei unterschiedliche Basen (Kaliumcarbonat, Triethylamin oder Pyridin) verwendet.



Schema 2: Synthese der linearen Sulfonamide: 1) Nucleophile Substitution zur Bildung des Sulfonamids 2) Reduktion der Nitrogruppe zum Amin 3) Nucleophile Substitution zur Bildung des Carbonsäureamids.

3.3.3 Modifikation des Strukturelements III

Am Anfang der Arbeit wurde das Strukturelement III nach der von P. MENZEL definierten Aufteilung der Ausgangsstruktur modifiziert (Abbildung 22). Es wurden elektronenschiebende (EDG) und elektronenziehende Gruppen (EWG) in unterschiedliche Positionen des Arylrests eingeführt. Die Synthesen verliefen zum Großteil problemlos und lieferten die in Abbildung 24 gezeigten Verbindungen mit Ausbeuten von 16-94 %. Die Synthese des Pyridin-

Derivats **Schl-38-012** und des Acetoxy-Derivats **Schl-38-015** gestaltete sich etwas schwieriger. So konnte bei der Verwendung von Kaliumcarbonat oder Triethylamin als Basen kein Umsatz beobachtet werden. Erst der Einsatz von Pyridin als Base und Lösungsmittel brachte das gewünschte Ergebnis. Bei **Schl-38-015** war nach einer mehrfachen säulenchromatographischen Reinigung eine Umkristallisation aus Isopropanol erforderlich, um das reine Produkt zu erhalten.

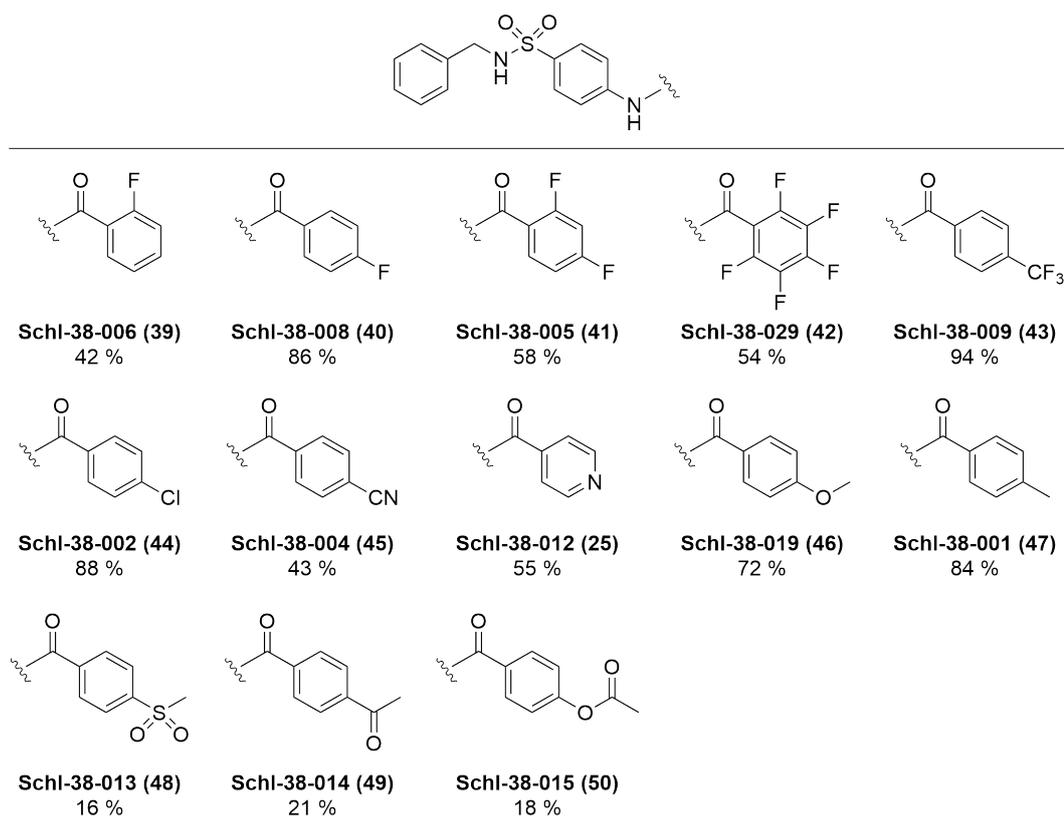
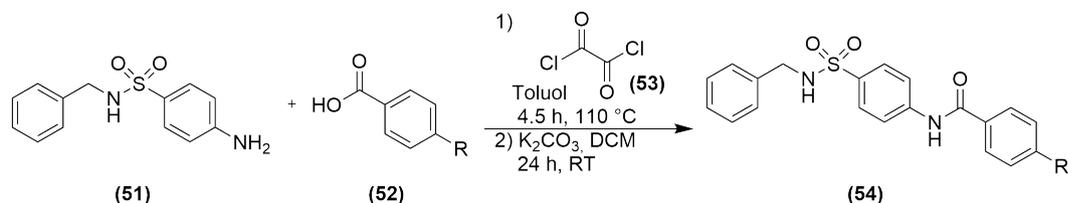


Abbildung 24: Dargestellte lineare Sulfonamide mit Modifikationen des Strukturelements III und ihre Ausbeuten.

Die Synthese der zwei Verbindungen **Schl-38-013** (Methylsulfonyl-Rest) und **Schl-38-014** (Methylcarbonyl-Rest) unterschied sich im letzten Schritt von der oben beschriebenen Syntheseroute, da zur Einführung des Acylrests 4-Methylsulfonylbenzoesäure und 4-Acetylbenzoesäure als Ausgangssubstanzen verwendet werden mussten. Zur Darstellung der Zielverbindungen wurden verschiedene Reaktionsbedingungen (Tabelle 3) getestet. Bei der Kupplungsreaktion mit unterschiedlichen Kupplungsreagenzien konnte kein Umsatz beobachtet werden.

So musste *in situ* eine Carbonsäureaktivierung mit Oxalylchlorid vorgenommen werden. Anschließend erfolgte die nucleophile Substitution mit Kaliumcarbonat als Base, was zum gewünschten Produkt führte (Schema 3). Die Reaktion ergab nur geringe Ausbeuten, was an einer eventuell unvollständigen Säureaktivierung liegen könnte. Die analoge Carbonsäureaktivierung mit Thionylchlorid führte hingegen zu keinem Reaktionsumsatz.



Schema 3: Synthese der linearen Sulfonamide mit der Carbonsäureaktivierung zum Carbonsäurechlorid.

Tabelle 3: Reaktionsbedingungen zur Darstellung der Verbindungen **Schl-38-013** und **Schl-38-014**.

Versuch	R	Reaktionsbedingungen	Ausbeute
1	COCH ₃	EDC · HCl, HOBT, Et ₃ N, 0 °C → RT, 24 h	-
2	COCH ₃	EDC · HCl, HOBT, Et ₃ N, 0 °C → RT, 24 h	-
3	SO ₂ CH ₃	HATU, DIPEA, 0 °C → RT, 24 h	-
4	SO ₂ CH ₃	HATU, DIPEA, 0 °C → RT, 24 h	-
5	SO ₂ CH ₃	DCC, DCM, 0 °C → RT, 2 h	-
6	SO ₂ CH ₃	Thionyl-Cl, Toluol, 100 °C, 4.5 h; Amin, THF, 0 °C → RT, 24 h	-
7	SO ₂ CH ₃	Oxalyl-Cl, Toluol, 100 °C, 4.5 h Amin, K ₂ CO ₃ , THF, 0 °C → RT, 24 h	16 %
8	COCH ₃	Oxalyl-Cl, Toluol, 100 °C, 4.5 h Amin, K ₂ CO ₃ , THF, 0 °C → RT, 24 h	21 %

Die biologischen Testungen mittels eines WST-1-Assay und DLA der zwei Verbindungen **Schl-38-001** (Methyl-Rest) und **Schl-38-002** (Chlor-Rest) wurden von FALK SCHULTE (Arbeitskreis GRÜNWELLER, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt. Im WST-1-Assay wurde ein CC₅₀ Wert von 146.3 μM und 183.9 μM ermittelt. Die beiden Verbindungen konnten so im Anschluss im DLA bei den Konzentrationen 50 μM und 100 μM getestet werden (Abbildung 25a und 25b). In den Abbildungen kann eine deutliche Reduktion der Translations-effizienz von mehr als 40 % für das Chlor-Derivat **Schl-38-001** und ungefähr 50 % für das

Methyl-Derivat **Schl-38-002** beobachtet werden. Wird die Translationseffizienz von β -Globin als Kontrolle betrachtet, so liegt jedoch nur ein unspezifischer Effekt vor (Abbildungen 25c und 25d).^[63] In Abbildung 26 sind die Ergebnisse des DLA für die anderen Derivate mit Modifikation des Strukturelements C zusammengestellt. Die biologischen Testungen für diese Verbindungen wurden von Dr. WIEBKE OBERMANN (Arbeitskreis GRÜNWELLER, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt.

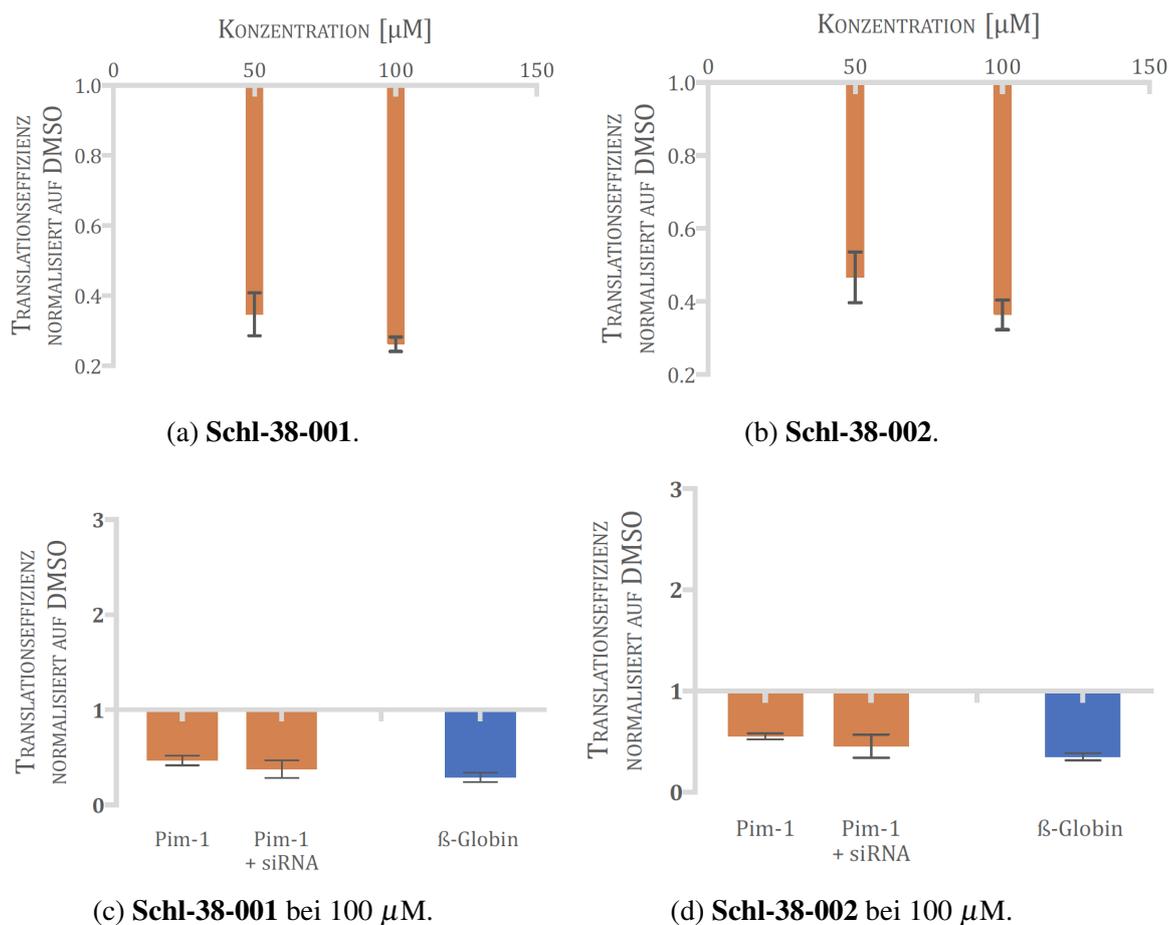


Abbildung 25: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz von PIM1 und β -Globin normalisiert auf DMSO ist für das Chlor-Derivat **Schl-38-001** und Methyl-Derivat **Schl-38-002** zusammengefasst. Die Bilder wurden aus der Dissertation von Dr. FALK SCHULTE leicht verändert übernommen.^[63]

Die Verbindungen **Schl-38-014** und **Schl-38-015** wurden nicht im DLA getestet, da sie im WST-1-Assay eine zu hohe Zytotoxizität gezeigt hatten. Alle nicht zytotoxischen Verbindun-

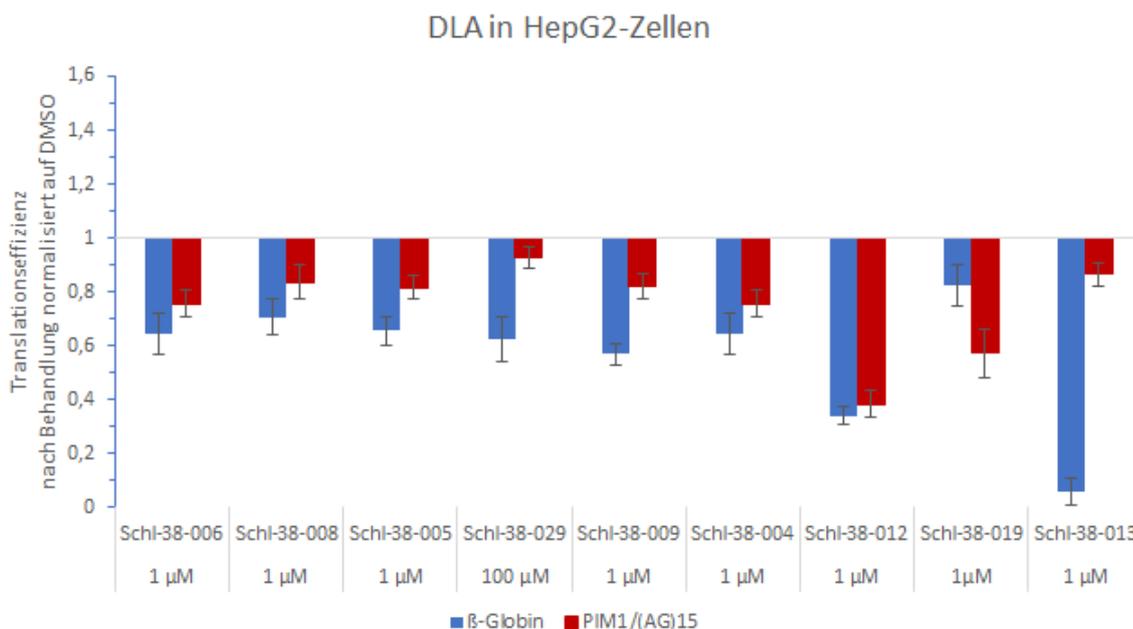


Abbildung 26: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene lineare Sulfonamide mit Modifikationen im Molekülteil C zusammengefasst.

gen wurden bei 1 μ M getestet. Hiervon ausgenommen war das Pentafluor-Derivat **Schl-38-029**, welches selbst bei einer Konzentration von 100 μ M keinen Effekt auf die Translationseffizienz zeigte. Bei den anderen Modifikationen waren ebenfalls kaum signifikante Werte für die Hemmung der Translationseffizienz zu beobachten. Erst ein inhibitorischer Effekt von über 20% wurde als signifikante Reduktion eingestuft. Dies konnte lediglich für das Pyridin-Derivat **Schl-38-012** und das Methoxy-Derivat **Schl-38-019** nachgewiesen werden. Da bei **Schl-38-012** jedoch auch β -Globin herunter reguliert wurde, handelte es sich bei dem beobachteten Effekt um einen unspezifischen. Bei **Schl-38-019** hingegen lag der Wert für β -Globin noch im normalen Bereich von ca. 20%. Daher liegt bei dieser Verbindung eine spezifische Hemmung vor. Auffällig in dieser Serie war im Übrigen das Methylsulfonyl-Derivat **Schl-38-013**, welches eine nahezu komplette Hemmung der Translationseffizienz des β -Globins bewirkte, aber keinen Effekt auf die Translation des PIM1 hatte.

3.3.4 Modifikation der funktionellen Gruppen

Der Schwerpunkt lag hier in der Untersuchung der Relevanz der zwei funktionellen Gruppen, nämlich des Sulfonamids und des Carbonsäureamids. In Abbildung 27 sind die verschiedenen Modifikationen gezeigt. Es wurde eine Matrix mit den Positionen der Sulfon- und Carbonsäureamide erstellt und in einer Verbindung das Carbonsäureamid durch ein Amin ersetzt. Die Synthese gestaltete sich analog zu der in Schema 2 (S.43) dargestellten Route.

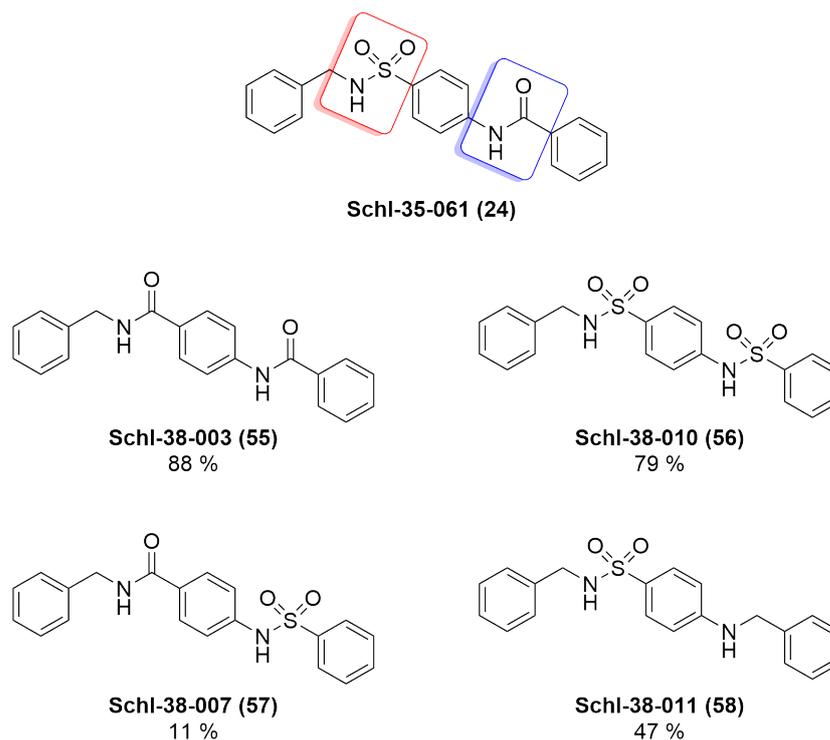


Abbildung 27: Dargestellte lineare Sulfonamide mit Modifikationen der funktionellen Gruppen und ihre Ausbeuten.

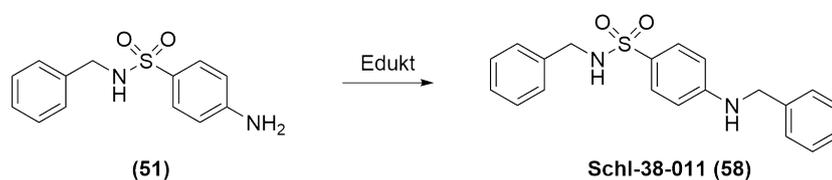
Die Synthese der Verbindung **Schl-38-003** gelang mit einer guten Ausbeute von 88 % und die von **Schl-38-007** mit einer geringen Ausbeute von 11 %, da es bei der Letzteren Schwierigkeiten in der Reinigung gab und dies folglich zu einem hohen Produktverlust führte. Bei Verbindung **Schl-38-010** war eine Optimierung der Reaktionsbedingungen nötig (Tabelle 4). Dabei wurden verschiedene Basen und Lösungsmittel getestet. Die Verwendung von Pyridin als Base und Lösungsmittel führte zur gewünschten Zielverbindung.

Tabelle 4: Reaktionsbedingungen zur Darstellung von **Schl-38-010**.

Versuch	Reaktionsbedingungen	Ausbeute
1	K ₂ CO ₃ , DCM, RT, 24 h	-
2	Et ₃ N, DCM, 0 °C → RT, 24 h	n.b.
3	DIPEA, THF, 0 °C → RT, 24 h	-
4	Pyridin, 0 °C → RT, 24 h	79 %

n.b.: nicht bestimmt aufgrund geringer Ausbeute,
sodass die Zielverbindung nur massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnte.

Auch bei **Schl-38-011** (Amin anstatt des Carbonsäureamids) waren mehrere Versuche notwendig, um das gewünschte Produkt zu erhalten (Tabelle 5). Zum einen wurden eine reduktive Aminierung, zum anderen eine nucleophile Substitution versucht. Die getesteten reduktiven Aminierungen führten nicht zum Erfolg. Es konnten nur die Edukte massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Bei der nucleophilen Reaktion mit Kaliumcarbonat konnte das Produkt massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Die Reaktion lieferte jedoch so geringe Mengen, dass die Ausbeute nicht bestimmt wurde. Erst die Substitution mit Triethylamin als Base führte zu **Schl-38-011** mit einer Ausbeute von 47 %.

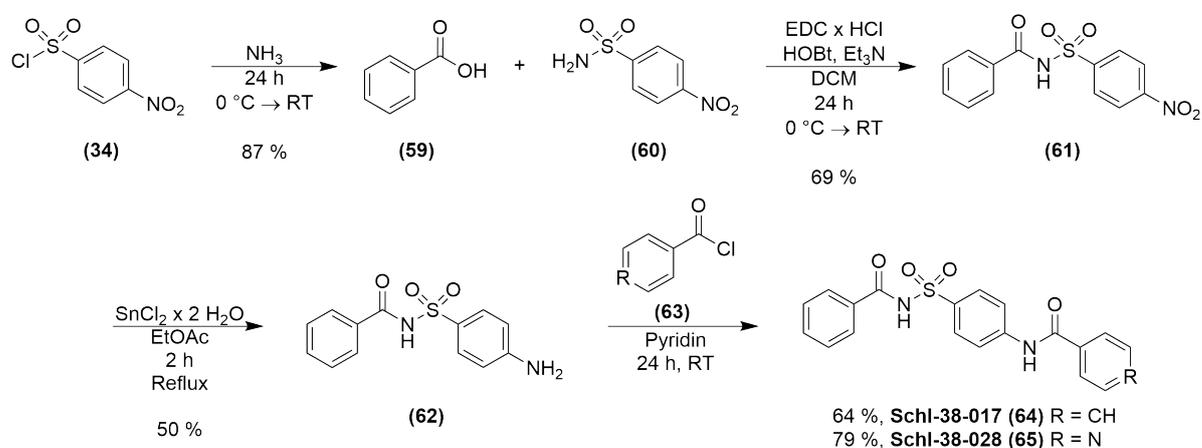
 Tabelle 5: Reaktionsbedingungen zur Darstellung von **Schl-38-011**.


Versuch	Edukt	Reaktionsbedingungen	Ausbeute
1	Benzaldehyd	aktiviertes Molsieb, MeOH, 0 °C → RT, 24 h; NaBH ₄ , EtOH, 0 °C → RT, 24 h	-
2	Benzaldehyd	aktiviertes Molsieb, DCM, 0 °C → RT, 16 h; NaBH ₄ , MeOH, RT, 2 h	-
3	Benzylbromid	K ₂ CO ₃ , DCM, 0 °C → RT, 72 h	n.b.
4	Benzylbromid	Et ₃ N, DCM, 0 °C → RT, 24 h	47 %

n.b.: nicht bestimmt aufgrund geringer Ausbeute,
sodass das Amin massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnte.

3.3.5 Synthese der Sulfonylbenzamid-Derivate

Die Darstellung der Sulfonylbenzamid-Derivate erfolgte in einer vierstufigen Synthese aus dem 4-Nitrobenzonsulfonylchlorid (Schema 4). Im ersten Schritt wurde das Sulfonsäureamid mit Ammoniak als Lösungsmittel hergestellt. Im zweiten Schritt wurde eine Kupplungsreaktion ausgehend von dem Sulfonsäureamid und der Benzoesäure mithilfe von EDC · HCl, HOBT und Triethylamin durchgeführt. Das resultierende *N*-((4-Nitrophenyl)sulfonyl)benzamid wurde anschließend mit Zinn(II)-chlorid zum Amin reduziert. Im letzten Schritt wurde eine nucleophile Substitution in wenig Pyridin als Base und ohne Lösungsmittel durchgeführt und lieferte so die Verbindungen **Schl-38-017** und **Schl-38-028** mit guten Ausbeuten von 64 % und 79 %.



Schema 4: Synthese der linearen Sulfonylbenzamid-Derivate.

Die ersten zwei Stufen der Synthese verliefen problemlos und mit guten Ausbeuten. Die Reduktion der Nitrogruppe zum Amin erzielte erstaunlicherweise nur eine Ausbeute von 50 %. Die Reinigung der Verbindung **Schl-38-017** mittels Umkristallisation gelang aus Isopropanol und bei **Schl-38-028** mittels einer Säulenchromatographie.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der biologischen Testung für die Derivate mit den unterschiedlichen funktionellen Gruppen zusammengefasst. Abbildung 28b zeigt die inhibitorische Wirkung der Ausgangsverbindung **Schl-35-061**, bestehend aus einem Sulfonamid und einem Carbonsäureamid, bei 50 μM und 100 μM . Hier wird deutlich, dass **Schl-35-061** eine starke Hemmwirkung auf die Translation besitzt. Der CC_{50} -Wert lag bei 121 μM . Für die Verbindung

Schl-38-003 mit den zwei Carbonsäureamid-Gruppen konnte eine Verbesserung der Zytotoxizität mit einem CC_{50} -Wert von über $180 \mu\text{M}$ beobachtet werden. Dies ging jedoch mit einem kompletten Verlust der Hemmwirkung einher (Abbildung 28a und 28c).^[63]

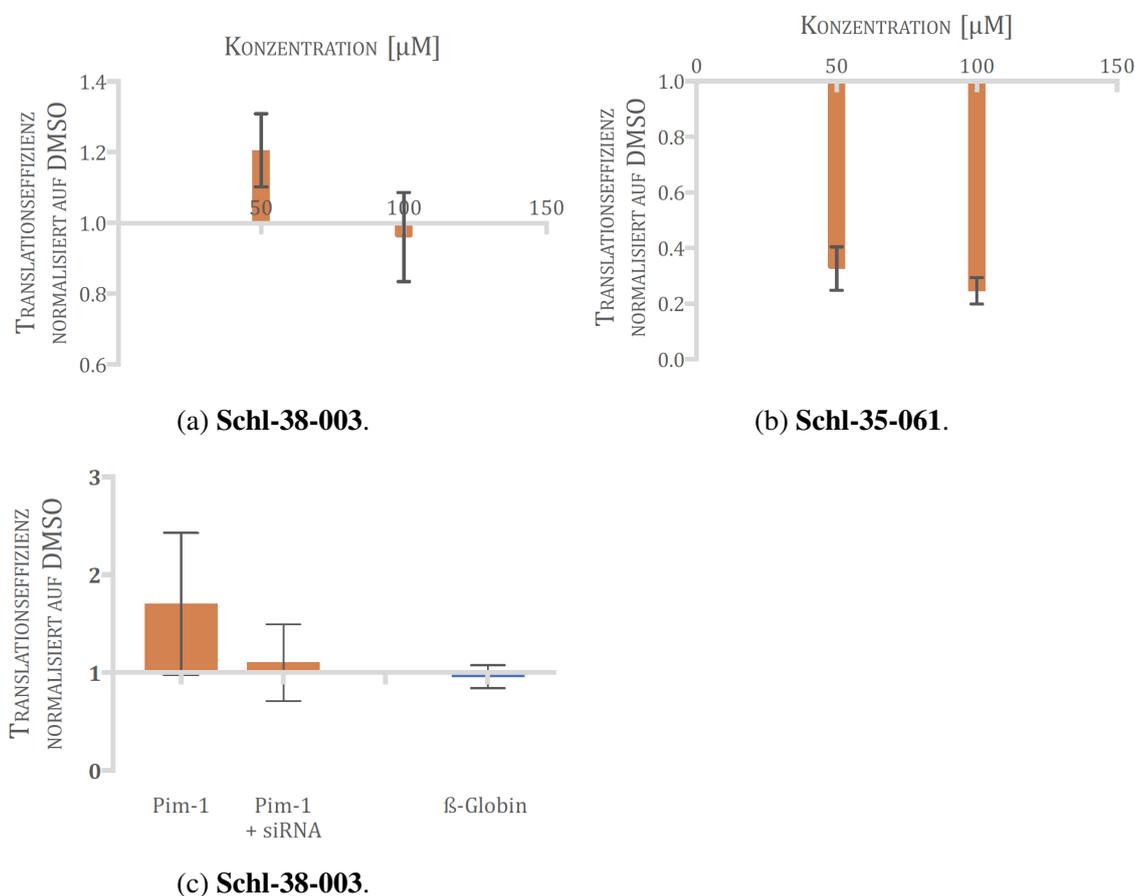


Abbildung 28: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz von PIM1 und β -Globin normalisiert auf DMSO ist für die Ausgangsverbindung **Schl-35-061** und **Schl-38-003**, mit zwei Carbonsäureamid-Strukturen, zusammengefasst. Die Bilder wurden aus der Dissertation von Dr. FALK SCHULTE unverändert übernommen.^[63]

In Abbildung 29 sind die Ergebnisse des DLA für die anderen vier Derivate zusammengestellt. Auffällig ist hier vor allem die Verbindung **Schl-38-007**, die im Vergleich zu **Schl-35-061** eine umgekehrte Positionierung der funktionellen Gruppen aufweist. Auch bei dieser Verbindung ging die Hemmwirkung auf die Translation verloren, zudem kam es zu einer nahezu vollständigen Reduktion der Translationseffizienz des β -Globins. Bei den Verbindungen mit dem

Sulfonamid (**Schl-38-010**) und dem sekundären Amin (**Schl-38-011**) anstelle des Carbonsäureamids konnte ebenfalls ein starker Verlust des inhibitorischen Effekts beobachtet werden. Auch das Sulfonylbenzamid-Derivat **Schl-38-017** zeigte keinen Effekt auf die Translation. Leider konnte der DLA aufgrund der hohen Zytotoxizität des analogen Derivats (**Schl-38-028**), nur mit einem Isonicotinoyl-Rest im Strukturelement III, nicht gemessen werden.

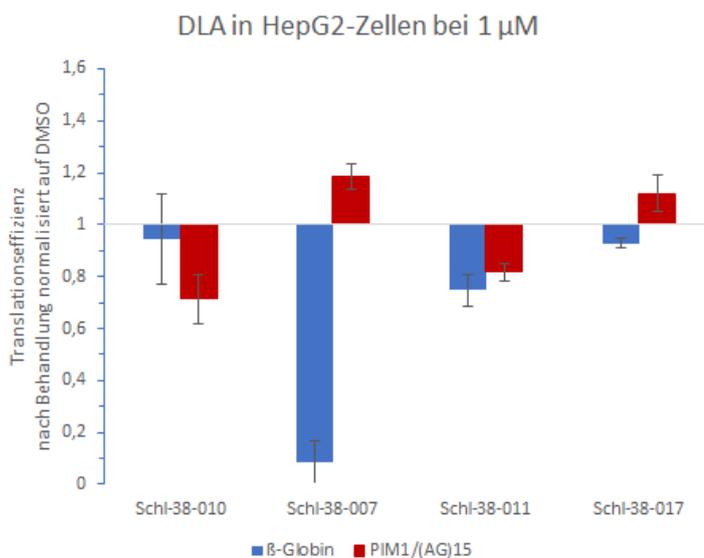


Abbildung 29: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene lineare Sulfonamide mit Modifikationen der funktionellen Gruppen zusammengefasst.

Abschließend kann geschlussfolgert werden, dass die Änderung der Positionierung der funktionellen Gruppen mit einem kompletten Verlust der inhibitorischen Wirkung einhergeht. Es ist folglich essentiell, dass das Sulfonamid im Strukturelement I und das Carbonsäureamid im Strukturelement III bestehen bleiben. Selbst ein Tausch der Position der funktionellen Gruppen ist nicht möglich und verursacht sogar eine nahezu vollständige Hemmung der Translationseffizienz von β -Globin, dessen Translation bei einer normalen Funktion der Zellen nicht beeinflusst werden sollte.

3.3.6 Modifikation des Strukturelements I

Die Darstellung der Aryl-substituierten *N*-Benzylsulfonamid-Derivate erfolgte analog zu der in Schema 2 (S.43) beschriebenen Route. Die Auswirkungen durch die Einführung unterschiedlicher EDGs und EWGs sollte hier untersucht werden. Für jedes Aryl-substituierte *N*-Benzylsulfonamid-Derivat wurde je ein Benzoyl- und ein Isonicotinoyl-Rest im Strukturelement III synthetisiert, da Verbindungen mit dem Isonicotinoyl-Rest bei vorangegangenen Testungen einen starken, aber unspezifischen inhibitorischen Effekt auf die Translation von 66 % bei einer Konzentration von 1 μM gezeigt hatte. In Abbildung 30 ist eine Zusammenfassung aller dargestellten Modifikationen mit ihren Ausbeuten zu sehen.

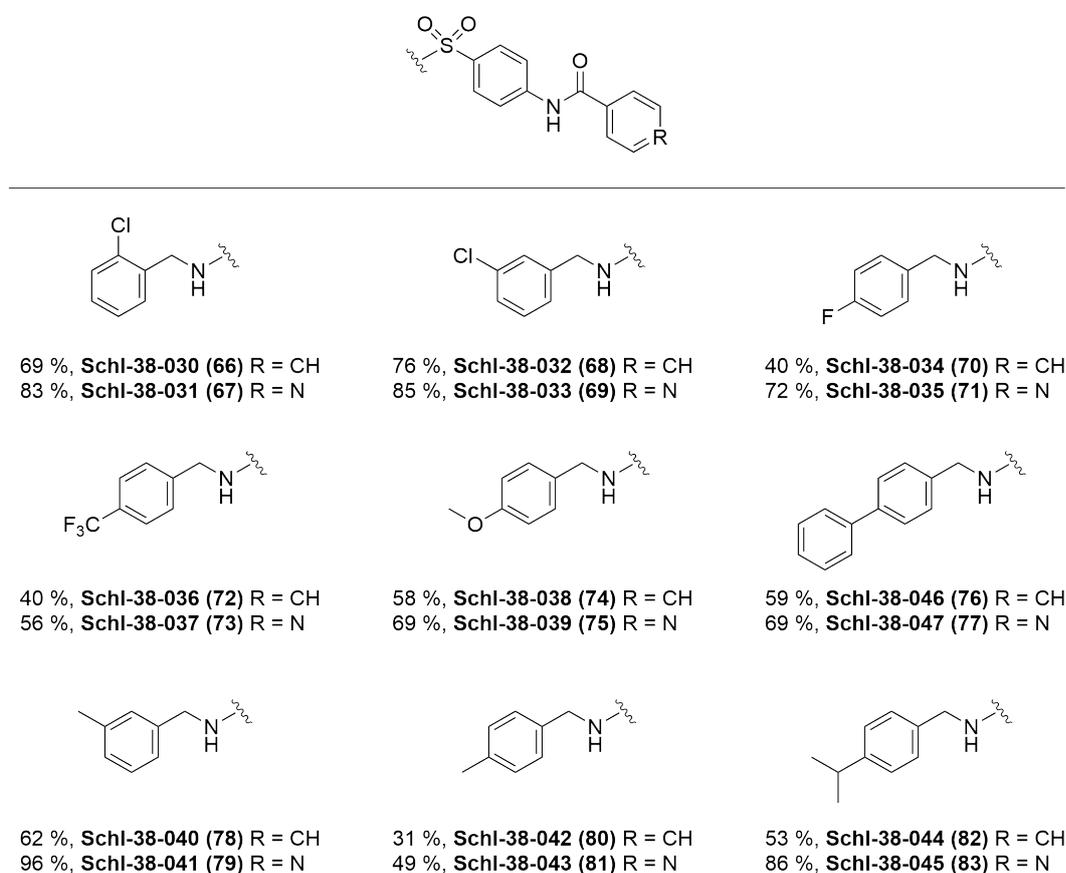


Abbildung 30: Dargestellte lineare Sulfonamide mit Modifikationen des Strukturelements I und ihre Ausbeuten.

Der erste Schritt der Synthese verlief ohne Probleme mit moderaten bis zu guten Ausbeuten (33-100 %) und der zweite Schritt mit guten bis quantitativen Ausbeuten (68-100 %). Die

Synthese und Reinigung der Verbindungen **Schl-38-030** bis **Schl-38-047** verlief zum Großteil ebenfalls gut. Bei einigen Verbindungen mit dem Benzoylrest war jedoch eine mehrfache Säulenchromatographie erforderlich. Zur Darstellung von **Schl-38-030** und **Schl-38-038** wurden Kaliumcarbonat als Base in DCM genutzt, die Synthese von **Schl-38-032**, **Schl-38-034**, **Schl-38-036**, **Schl-38-038** und **Schl-38-040** gelang ohne Base in DCM. Die übrigen Verbindungen wurden durch eine Reaktion in Pyridin als Base und Lösungsmittel dargestellt. Entscheidend für eine erfolgreiche Darstellung der Zielverbindungen war hierbei, dass die Synthesen mit dem Isonicotinoyl-Rest in Pyridin durchgeführt wurden. Bei der Synthese der Zielverbindungen mit dem Benzoylrest im Strukturelement III konnte die Base frei gewählt oder gänzlich weggelassen werden. Aus der Übersicht lässt sich ein Trend dahingehend ablesen, dass die Darstellung der Isonicotinoyl-Derivate im Vergleich zu den Benzoyl-Derivaten bessere Ausbeuten lieferte. Dies kann durch die erhöhte Elektrophilie des Säurechlorids erklärt werden, denn der Pyridylrest ist aufgrund seines zusätzlichen Stickstoffs elektronenärmer als der Benzoylrest.

In Abbildung 31 sind die Ergebnisse des DLA für alle Verbindungen mit einer EWG und in Abbildung 32 mit einer EDG im Strukturelement I gezeigt. Bei der biologischen Testung wurden abhängig von der Verbindung Löslichkeitsprobleme festgestellt. So waren alle Verbindungen, abgesehen von denen, die einen Methylrest in der *meta*-Position (**Schl-38-040** und **Schl-38-041**) aufweisen, bei einer Konzentration von 100 μM nicht löslich. Nicht löslich bei einer Konzentration von 10 μM waren vier Verbindungen mit einem Isonicotinoyl-Rest (**Schl-38-033**, **Schl-38-031**, **Schl-38-037**, **Schl-38-039**) und zwei Verbindungen mit einem Benzoylrest (**Schl-38-034** und **Schl-38-044**). Diese Verbindungen wurden im DLA dann bei einer Konzentration von 1 μM getestet.

Die Verbindungen mit EWGs im Strukturelement I wurden bei Konzentrationen von 1 μM bzw. 10 μM im DLA untersucht. Hierbei konnte durch die in *ortho*- (**Schl-38-030**, **Schl-38-031**) und *para*-Chlor-substituierten Verbindungen (**Schl-38-032**, **Schl-38-033**) eine vergleichbar unspezifische Hemmwirkung erzielt werden. Unabhängig von der Position der Chlorsub-

stituenten zeigten die Derivate mit einem Benzoylrest einen stärkeren Effekt auf die Translationseffizienz als die entsprechenden Isonicotinoyl-Derivate (**Schl-38-031** und **Schl-38-033**). Bei den Fluor-Derivaten hingegen bewirkte das Isonicotinoyl-Derivat **Schl-38-035** eine ähnlich starke Hemmwirkung wie die Chlor-Derivate mit dem Benzoylrest. Nur der Trifluormethyl-Rest (**Schl-38-036** und **Schl-38-037**) führte zu einem kompletten Verlust des inhibitorischen Effekts.

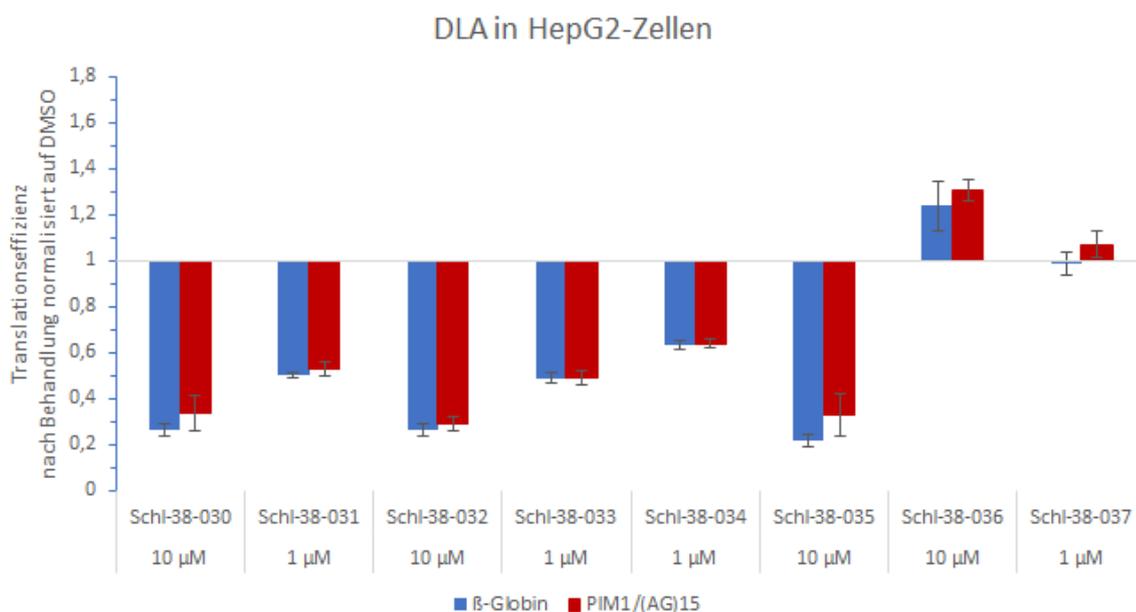


Abbildung 31: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene lineare Sulfonamide mit EWGs im Strukturelement I zusammengefasst.

Die Testung der Verbindungen mit den verschiedenen EDGs erfolgte bei 1 µM bzw. 10 µM. Als EDGs wurden unterschiedliche Alkylreste mit verschiedenen Längen, Größen und Verzweigungen sowie eine Methoxygruppe ausgewählt. Insgesamt konnte ein Verlust des inhibitorischen Effekts auf die Translation für diese Serie beobachtet werden. Nur bei **Schl-38-043**, mit einer *para*-Methylgruppe im Strukturelement I und einem Isonicotinoyl-Rest, war ein starker, aber unspezifischer Effekt von 66 % zu sehen. Auffällig ist, dass die Derivate mit einem Methyl-Rest in *meta*-Position (**Schl-38-040** und **Schl-38-041**) gar keinen inhibitorischen Effekt auf die Translation ausübten, sondern sogar eine Hochregulation der Translationseffizienz

von β -Globin und (AG)₁₅ zu beobachten war. Die vielversprechendste Verbindung dieser Serie war aber **Schl-38-038**, mit einem Methoxy-Rest und einem Benzoylrest. Hier konnte ein spezifischer inhibitorischer Effekt von 25 % auf die Translation von (AG)₁₅ ermittelt werden.

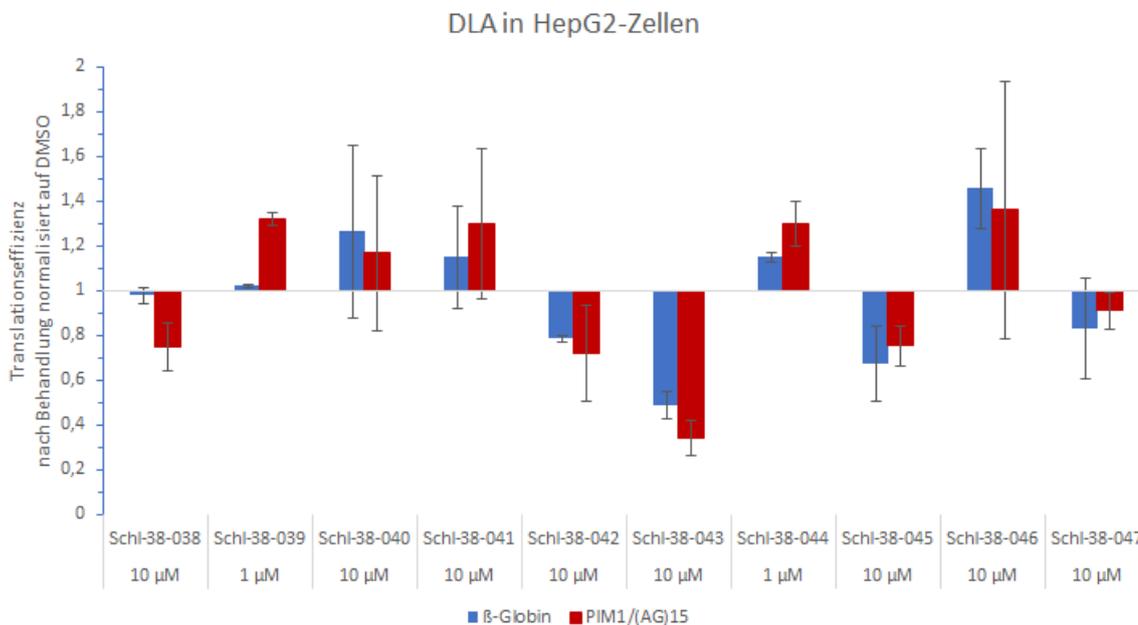
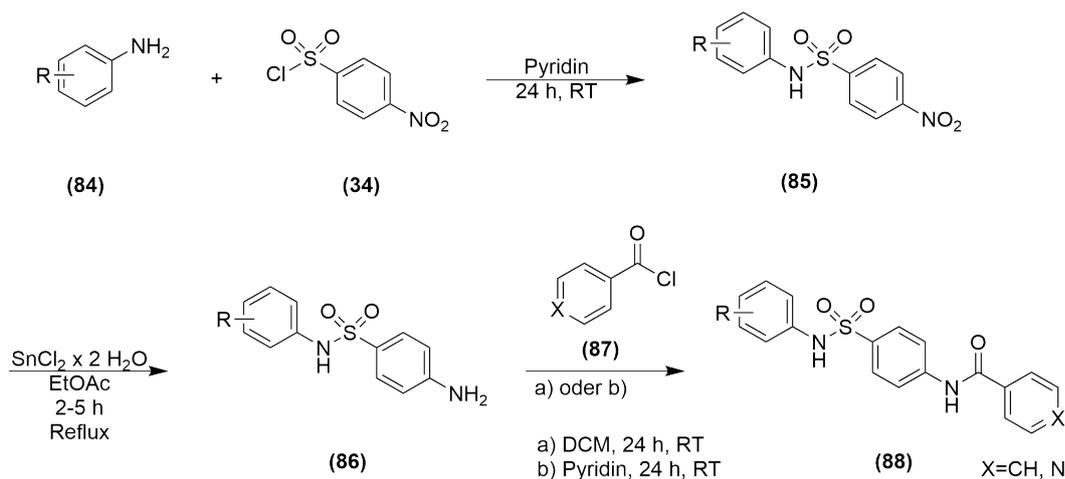


Abbildung 32: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene lineare Sulfonamide mit EDGs im Molekülteil A zusammengefasst.

Bei der Untersuchung der unterschiedlichen Effekte der EWGs und EDGs auf die Translation konnte festgestellt werden, dass alle Verbindungen mit EWGs, mit Ausnahme der Verbindung mit einem Trifluormethyl-Rest, eine Reduktion der Translationseffizienz von β -Globin und PIM1 bzw. (AG)₁₅ bewirken. Die Einführung von EDGs in das Strukturelement I führte mit Ausnahme der Derivate mit *para*-Methyl-Rest und mit dem vielversprechenden Methoxy-Rest (**Schl-38-038**) zu einem Verlust der Hemmwirkung. Unter den zwei Derivaten mit *para*-Methyl-Rest zeigte jedoch das Derivat mit einem Isonicotinoyl-Rest (**Schl-38-043**) einen deutlich stärkeren unspezifischen Effekt auf die Translation als das Derivat mit einem Benzoylrest (**Schl-38-042**).

3.3.7 Variation des Abstands im Strukturelement I

Die Synthese der folgenden Derivate wurde wie in Schema 5 beschrieben durchgeführt. Für die Darstellung der Derivate wurde ein Sulfonsäurechlorid mit verschiedenen Anilinen umgesetzt. Zur Untersuchung der Effekte auf die Translation wurden unterschiedliche EDGs und EWGs am Phenylrest eingeführt und bei dem Strukturelement III jeweils der Benzoyl- und Isonicotinoyl-Rest verwendet.



Schema 5: Synthese der linearen Sulfonamide: 1) Nucleophile Substitution zur Bildung des Sulfonamids 2) Reduktion der Nitrogruppe zum Amin 3) Nucleophile Substitution zur Bildung des Carbonsäureamids.

Der erste Schritt der Synthese wurde im Unterschied zur üblicherweise verwendeten Route in Pyridin durchgeführt und lief problemlos mit Ausbeuten von 47-79 %. Auch die Reduktion im zweiten Schritt verlief gut mit guten bis zu nahezu quantitativen Ausbeuten (65-95 %). Im letzten Schritt wurden die gewünschten Zielverbindungen durch eine nucleophile Substitution, im Falle der Isonicotinoyl-Derivate in Pyridin und im Falle der Benzoyl-Derivate ohne Base in DCM, hergestellt. Die Ausnahme war **Schl-38-057**, bei der die Reaktion in Pyridin keinen Reaktionsumsatz der Edukte zeigte und erst die Reaktion ohne Base zum Erfolg führte. Die Ausbeuten der Verbindungen **Schl-38-048** bis **Schl-38-057** sind in Abbildung 33 zusammengefasst.

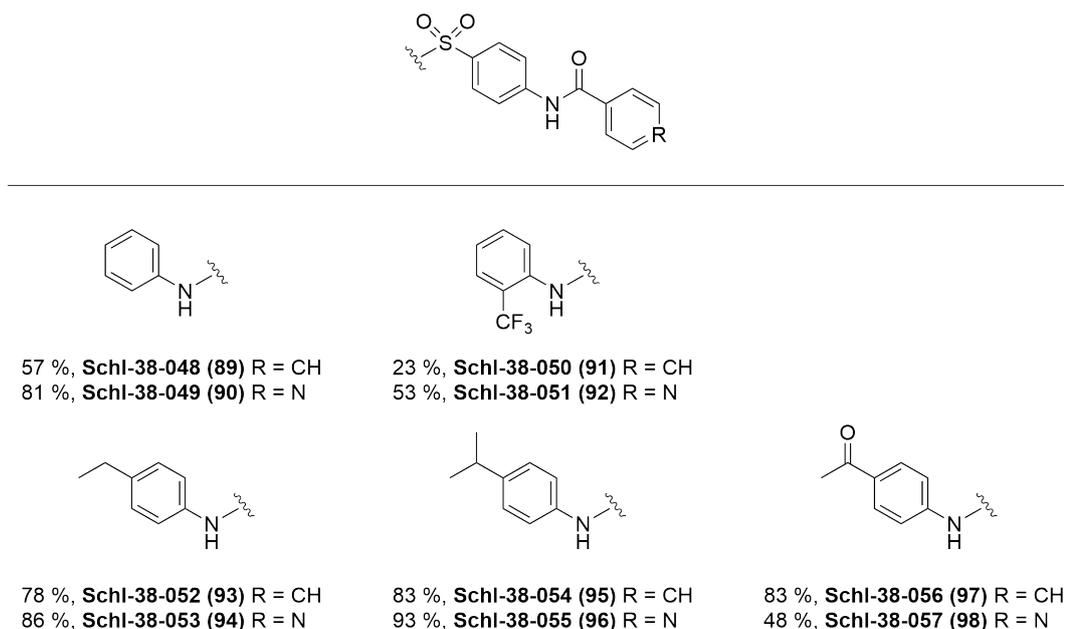


Abbildung 33: Dargestellte lineare Sulfonamide mit Modifikationen des *N*-Aryl-Sulfonamids und ihre Ausbeuten.

In Abbildung 34 sind die biologischen Ergebnisse der Verbindungen mit einem Phenylrest im Strukturelement I zusammengefasst. Dabei zeigten die Verbindungen mit einem unsubstituierten Phenylrest nur einen unspezifischen Effekt auf die Translation (**Schl-38-048** und **Schl-38-049**). **Schl-38-050**, das einen Trifluormethyl-Rest in *ortho*-Position trägt und einen Benzoylrest besitzt, war die vielversprechendste Verbindung mit einem spezifischen inhibitorischen Effekt von 46 % bei einer Konzentration von 10 μM . Die Translationseffizienz von β -Globin war dabei nahezu um 20 % reduziert. Allerdings war die Standardabweichung von β -Globin sehr hoch, was die Aussagekraft dieses Effekts einschränkt. Eine weniger spezifische Hemmung der Translation von 24 % bei einer Konzentration von 10 μM konnte für **Schl-38-055**, mit einem Isopropyl-Rest und einem Isonicotinoylrest, und für **Schl-38-053**, mit einem Ethyl-Rest und einem Isonicotinoylrest, beobachtet werden. Die Verbindungen mit den restlichen Substituenten zeigten zu keinem inhibitorischen Effekt, unabhängig davon, ob es sich bei den Substituenten um eine EWG oder EDG handelte. Erstaunlich hoch reguliert war die Translation nur durch die Verbindung **Schl-38-056** mit einem Methylcarbonyl-Rest und Benzoylrest.

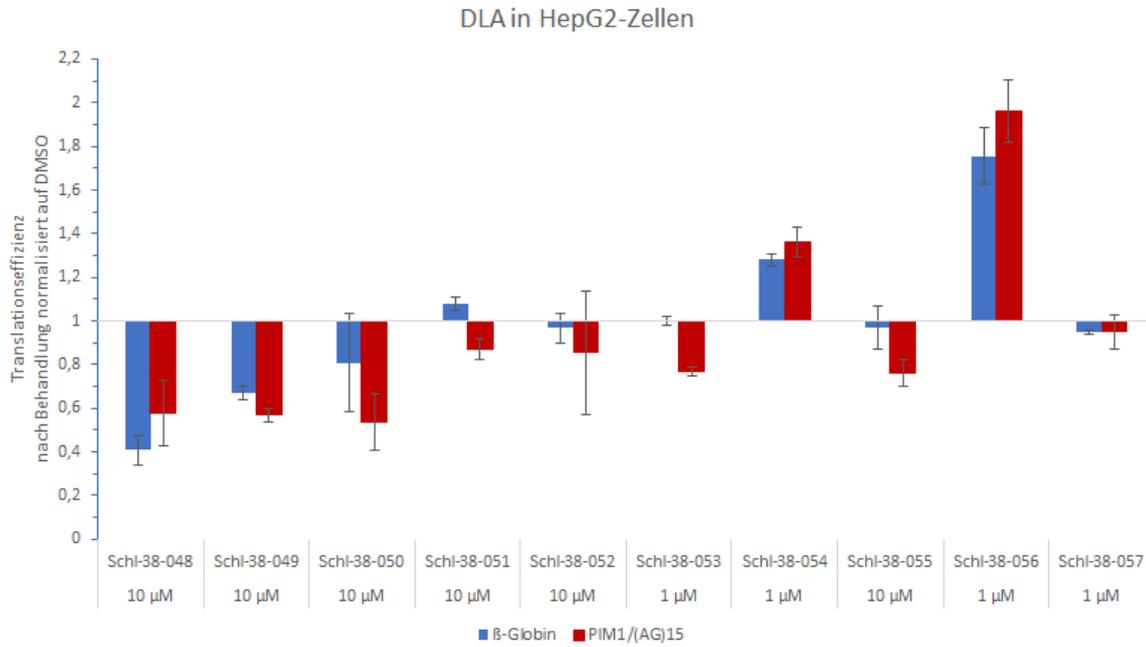


Abbildung 34: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene lineare Sulfonamide mit Modifikationen des *N*-Aryl-Sulfonamids zusammengefasst.

3.3.8 Modifikationen der Strukturelemente I und III

Nach der Auswertung der biologischen Ergebnisse des TSA konnte eine signifikante Verschiebung der Temperatur bei **Schl-38-019** (1.78 °C) und **Schl-38-038** (2.87 °C) beobachtet werden. Diese beiden Verbindungen enthalten jeweils eine Methoxygruppe in der *para*-Position des *N*-Benzyl- bzw. des Benzoylrests. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden beide Modifikationen in einem linearen Sulfonamid kombiniert (Abbildung 35). Die Synthese der Verbindung verlief ohne größere Probleme mit einer geringen Ausbeute von 18 %. Grund für den großen Ausbeutenverlust war eine abschließende Umkristallisation aus Isopropanol, um eine zufriedenstellende Reinheit zu erzielen.

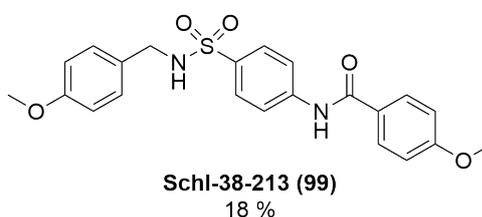


Abbildung 35: Dargestelltes lineares Sulfonamid mit Modifikationen der Strukturelemente I und III. Es wurde kein DLA durchgeführt, da die Verbindung im WST-1-Assay keine Zytotoxizität bei Konzentrationen von 10 μ M und 100 μ M zeigte.

In den biologischen Untersuchungen wies **Schl-38-213** im WST-1-Assay keine Zytotoxizität bei den getesteten Konzentrationen von 10 μ M und 100 μ M auf, sodass im Anschluss kein DLA durchgeführt wurde. Hintergrund dessen war, dass die fehlende Zytotoxizität nach Erfahrungswerten der Arbeitsgruppe GRÜNWELLER indizierte, dass keine spezifische Hemmung im DLA zu erwarten war.

3.3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse der linearen Sulfonamide

Nach der umfangreichen Untersuchung der Stoffklasse der linearen Sulfonamide durch verschiedene Modifikationen in den Strukturelementen I und III konnten drei Verbindungen identifiziert werden, die bei einer Konzentration von 10 μM einen spezifischen inhibitorischen Effekt auf die Translation von ungefähr 25 % haben (Abbildung 36). Bei zwei weiteren Verbindungen (**Schl-38-050** und **Schl-38-019**) war die spezifische Hemmung der Translation weniger stark ausgeprägt, da die Translationseffizienz um nahezu 20 % reduziert wurde. Dieser Wert liegt somit genau auf Grenze zur Differenzierung eines spezifischen Effekts von einem unspezifischen.

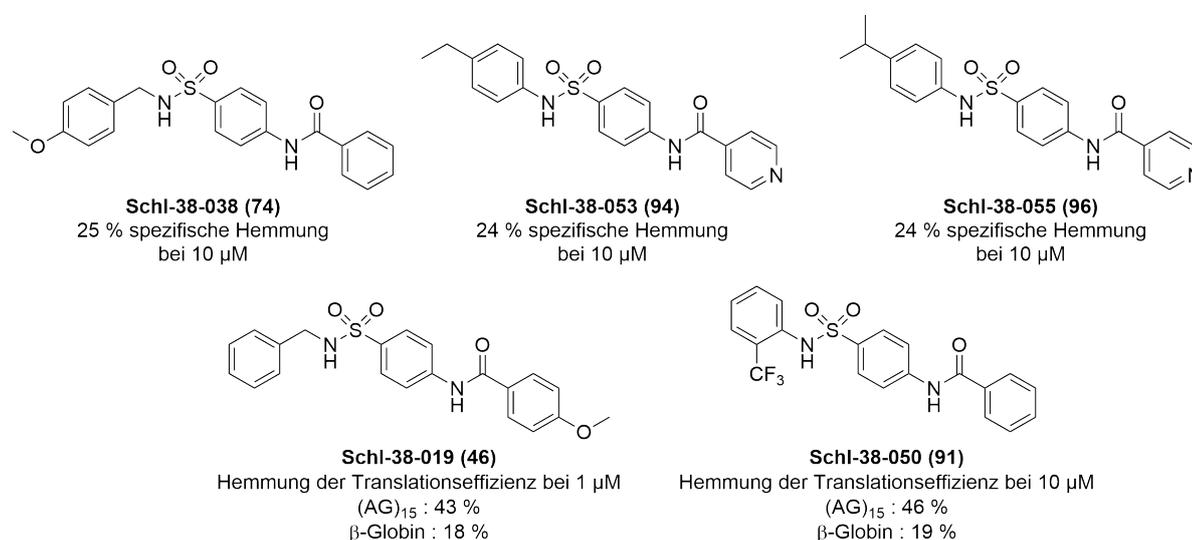


Abbildung 36: Übersicht der Verbindungen aus der Stoffklasse der *N*-Acylaminosäureamide mit einem spezifischen Hemmeffekt auf die Translation.

Mit Blick auf die Ausgangssituation, in der nur eine Verbindung mit einem unspezifischen Effekt vorlag, konnte am Ende dieser Serie vielversprechende Derivate mit einer eIF4A-spezifischen Hemmung erhalten werden.

3.4 Propellerartige Sulfonamide

3.4.1 Motivation und Idee

Die Motivation hinter der Serie der propellerartigen Sulfonamide war die Idee, drei aromatische Reste über eine zentrale funktionelle Gruppe so zu verknüpfen, dass sie eine ähnliche räumliche Anordnung zueinander einnehmen können, wie die drei Ringe in den Roglamiden. An der Grundstruktur dieses Strukturtyps wurden verschiedene Modifikationen vorgenommen (Abbildung 37). Durch die Variation der Substituenten an den Arylresten und unterschiedlicher Abstände zwischen den Arylresten und dem Sulfonamid-Stickstoff konnten so 14 propellerartige Sulfonamide synthetisiert werden.

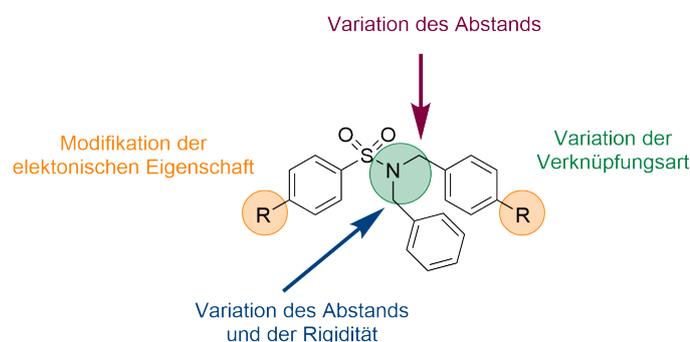
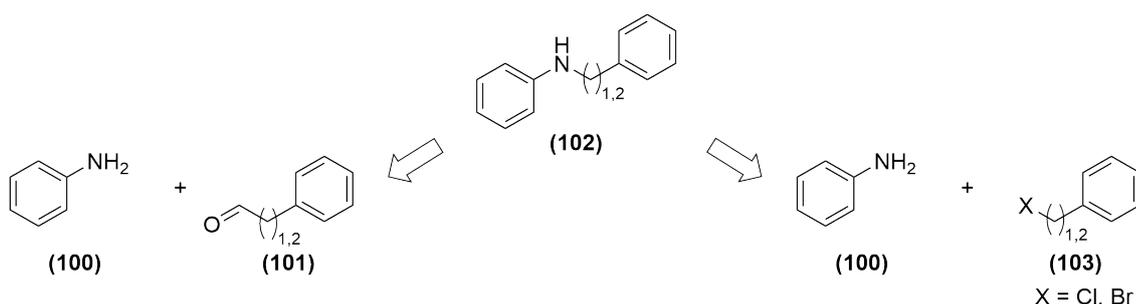


Abbildung 37: Modifikationen an der Struktur der propellerartigen Sulfonamide.

3.4.2 Optimierung der Synthese der sekundären Amine

Zur Synthese der Zielverbindungen war die Synthese unterschiedlicher sekundärer Amine notwendig. Da sekundäre Amine teilweise sehr teuer oder nicht käuflich waren, mussten diese Edukte selbst synthetisiert werden. In Schema 6 sind zwei Möglichkeiten zur Synthese solcher sekundären Amine dargestellt. Zum einen kann dies durch eine reduktive Aminierung aus einem Aldehyd und einem primären Amin erfolgen. Zum anderen besteht die Möglichkeit einer nucleophilen Substitution ausgehend von einem primären Amin und einem Benzylhalogenid.



Schema 6: Synthese der sekundären Amine.

Die getesteten Reaktionsbedingungen für eine reduktive Aminierung (Tabelle 6) führten zu keinem Umsatz der verwendeten Edukte und wurden verworfen.

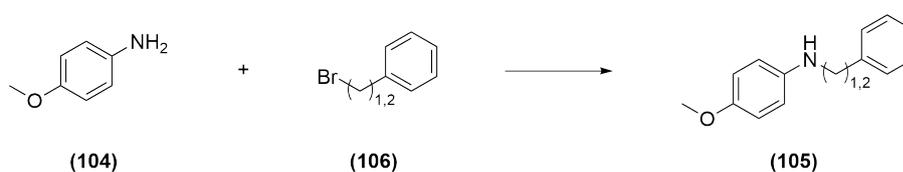
Tabelle 6: Reaktionsbedingungen zur Darstellung eines sekundären Amins mittels reduktiver Aminierung.

Versuch	n	Reaktionsbedingungen	Ausbeute
1	1, 2	1) aktiviertes Molsieb, DCM, 0 °C → RT, 24 h 2) NaBH ₄ , MeOH, 0 °C → RT, 4 d	-
2	1, 2	1) MeOH, 0 °C → RT, 3 d 2) NaBH ₄ , MeOH, 0 °C → RT, 24 h	-
3	2	Pd(OAc) ₂ , MeOH, 2 h, RT; 24 h, Reflux	-

Die Synthese des sekundären Amins (**105**) mit n=1 konnte erfolgreich durch eine nucleophile Substitution mit Triethylamin als Base erzielt und das gewünschte Produkt mit einer Ausbeu-

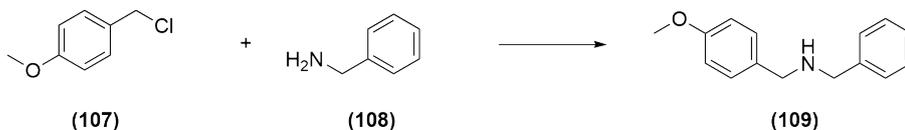
te von 28 % erhalten werden. Dieselben Reaktionsbedingungen lieferten bei der Umsetzung von Phenylethylbromid jedoch nur eine verschwindend geringe Ausbeute von 2 %. Dies machte weitere Optimierungen erforderlich, da es sich bei dem Amin um ein Edukt handelte, welches in größeren Mengen benötigt wurde. Es wurden die in Tabelle 7 beschriebenen Reaktionsbedingungen erprobt, in denen Basen und Reaktionszeiten variiert wurden. Die beste Ausbeute von 67 % konnte durch eine Mikrowellenreaktion mit DIPEA als Base und DMF als Lösungsmittel erreicht werden.

Tabelle 7: Reaktionsbedingungen zur Darstellung des sekundärenamins mittels einer nucleophilen Substitution.



Versuch	n	Reaktionsbedingungen	Ausbeute
1	1	Et ₃ N, DCM, RT, 24 h	28 %
2	2	Et ₃ N, DCM, RT, 24 h	2 %
3	2	NaH, THF, 0 °C → RT, 24 h; 3 h Reflux	-
4	2	K ₂ CO ₃ , ACN, 0 °C → RT, 3 d	11 %
5	2	DIPEA, DMF, Mikrowelle: 100 °C, 30 mbar, max. 300 W, 1 h preMix 30 s mit Kühlung	67 %

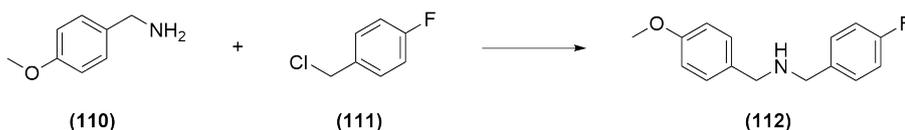
Bei der Synthese des sekundärenamins (**109**) wurden drei verschiedene Mikrowellenreaktionen getestet, wobei der 3. Versuch das beste Ergebnis mit einer Ausbeute von 20 % lieferte. Anzumerken ist, dass diese Reaktionsbedingungen anschließend in einem fünffach größeren Ansatz angewendet wurden und es hierbei zu einem starken Verlust an Ausbeute (7 %) kam. Weiterhin wurde Natriumhydrid in THF als Reaktionsbedingung erprobt, was das gewünschte Produkt nach dem Massenspektrum lieferte, jedoch eine für praktische Zwecke zu geringe, nicht bestimmbare Ausbeute erbrachte. Unter den getesteten Reaktionsbedingungen konnte die beste Ausbeute (26 %) mit DIPEA in Toluol erreicht werden. Eine Übersicht der getesteten Bedingungen ist in Tabelle 8 zu sehen.

Tabelle 8: Reaktionsbedingungen zur Darstellung des sekundärenamins (**109**) mittels einer nucleophilen Substitution.


Versuch	Reaktionsbedingungen	Ausbeute
1	DIPEA, DMF, Mikrowelle: 100 °C, 15 mbar, max. 200 W, 1 h preMix 30 s mit Kühlung	n.b.
2	DIPEA, DMF, Mikrowelle: 100 °C, 15 mbar, max. 200 W, 1.5 h preMix 30 s mit Kühlung	n.b.
3	DIPEA, DMF, Mikrowelle: 100 °C, 30 mbar, max. 300 W, 1.5 h preMix 30 s mit Kühlung	20 %
4	NaH, THF, RT, 24 h	n.b.
5	DIPEA, Toluol, Reflux, 4 h	26 %

n.b.: nicht bestimmt aufgrund geringer Ausbeute, sodass das Amin massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnte.

Die Darstellung des sekundärenamins (**112**) erfolgte ebenfalls mithilfe einer nucleophilen Reaktion. Wiederum wurden verschiedene Reaktionsbedingungen (Tabelle 9) getestet. Alle Versuche lieferten das gewünschte Produkt in moderaten Ausbeuten. Auffällig ist, dass hier wie bei dem Amin (**109**) die beste Ausbeute mit DIPEA als Base in Toluol erzielt werden konnte.

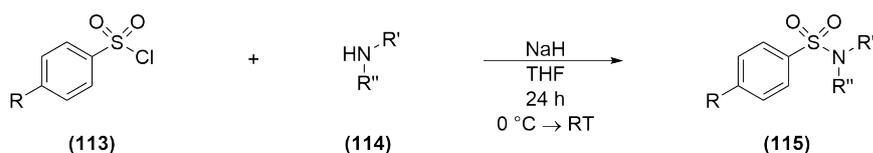
 Tabelle 9: Reaktionsbedingungen zur Darstellung des sekundärenamins (**112**) mittels einer nucleophilen Substitution.


Versuch	Reaktionsbedingungen	Ausbeute
1	DIPEA, DMF, Mikrowelle: 100 °C, 30 mbar, max. 300 W, 1.5 h preMix 30 s mit Kühlung	21 %
2	Et ₃ N, DCM, RT, 24 h	26 %
2	K ₂ CO ₃ , ACN, RT, 24 h	34 %
3	DIPEA, THF, 70 °C, 1.5 h	28 %
4	DIPEA, DMF, 150 °C, 2 h	10 %
5	DIPEA, Toluol, 110 °C, 4 h	36 %

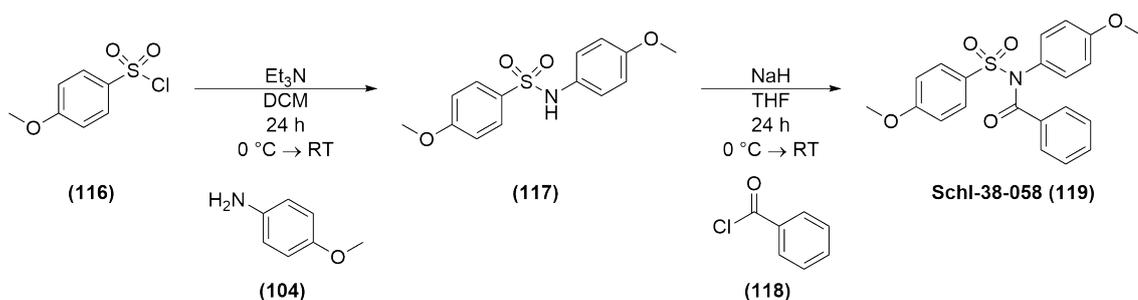
Zusammenfassend lässt sich hinsichtlich der verschiedenen Optimierungen zur Darstellung sekundärer Amine feststellen, dass die besten Ergebnisse durch eine nucleophile Substitution erreicht werden können. Es konnten gute Ausbeuten durch eine Mikrowellenreaktion mit DIPEA in DMF oder eine Reaktion in Toluol, ebenfalls mit DIPEA als Base, erzielt werden. Beide Reaktionen wurden bei 100 °C bzw. 110 °C gerührt. Es sei darauf hingewiesen, dass bei der Synthese das Amin sofort säulenchromatographisch gereinigt werden muss, da es einen Tag später bereits zersetzt ist. Nach der Reinigung dagegen ist das sekundäre Amin stabil.

3.4.3 Synthese der propellerartigen Sulfonamide

Die Darstellung der propellerartigen Sulfonamide erfolgte in einer einstufigen Synthese aus den Sulfonsäurechloriden (**113**) und den entsprechenden sekundären Aminen (**114**) (Schema 2, S.43). Dabei handelt es sich um eine nucleophile Substitution mit Natriumhydrid als Base. Der Fokus lag hierbei vor allem bei der Modifikation der Substituenten am Sulfonamid-Stickstoff.



Schema 7: Synthese der propellerartigen Sulfonamide.



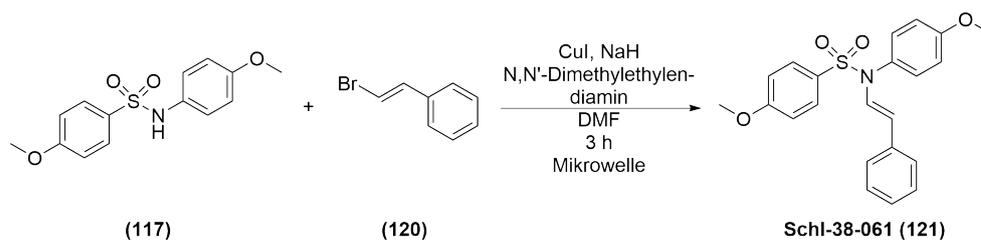
Schema 8: Synthese der propellerartigen Sulfonamide.

Bei Verbindung **Schl-38-058** konnte der oben beschriebene Syntheseweg nicht angewendet werden. Hier erwies sich der in Schema 8 gezeigte Weg als erfolgreiche Alternative. Zunächst wurde das Sulfonsäurechlorid (**116**) in einer nucleophilen Substitution mit dem pri-

mären Amin (**104**) mit einer Ausbeute von 74 % zum Sulfonamid (**117**) umgesetzt. Anschließend wurde das Sulfonamid mit dem Benzoylchlorid (**118**) zur Reaktion gebracht und das gewünschte Produkt konnte mit einer Ausbeute von 66 % erhalten werden.

Die Darstellung der Verbindung **Schl-38-061** erfolgte im ersten Schritt analog zu der von Verbindung **Schl-38-058**, der zweite Schritt dagegen war schwieriger zu realisieren. Die von NAKANISHI *et al* publizierte Reaktionsvorschrift^[65] diente als Anleitung zur Synthese dieses Sulfonamids. Dieser Vorschrift folgend wurde Caesiumcarbonat als Base, THF als Lösungsmittel, Kupferiodid sowie *N,N'*-Dimethylethylendiamin für die Reaktion verwendet. Die Synthese wurde unter Argon-Atmosphäre durchgeführt und führte nach 3 h unter Rückfluss Rühren zu keinem Umsatz der verwendeten Edukte. Daraufhin wurden 2.0 eq Kaliumcarbonat als Base hinzugefügt, um die Auswirkungen einer anderen Base zu testen, was ebenfalls keinen Erfolg zeigte. Im zweiten Versuch wurde die Reaktionszeit auf 8 h unter Rückfluss und 3 Tage bei Raumtemperatur verlängert und Natriumhydrid als Base verwendet. Auch unter diesen Bedingungen waren bei der Reaktionskontrolle nur die Edukte zu finden.

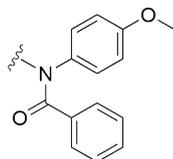
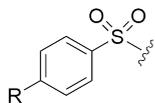
Die zweite Stufe gelang einzig durch eine Mikrowellenreaktion in DMF mit CuI und Natriumhydrid als Base und einer bescheidenen Ausbeute von 17 % (Schema 9). Die Bedingungen in der Mikrowelle waren 100 °C, 30 mbar, max. 300 W und ein preMix von 30 s mit Kühlung.



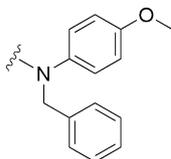
Schema 9: Synthese der propellerartigen Sulfonamide.

In Abbildung 38 ist eine Übersicht der synthetisierten propellerartigen Sulfonamide mit ihren Ausbeuten gezeigt. Die Ausbeuten sind insgesamt eher niedrig bis moderat. Die Synthese der Verbindungen **Schl-38-067**, **Schl-38-069** und **Schl-38-071** konnte aus den entsprechenden

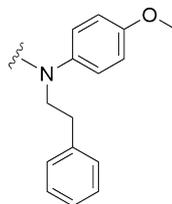
Nitroverbindungen durch eine Reduktion mittels Zinn(II)-chlorid mit quantitativen Ausbeuten realisiert werden.



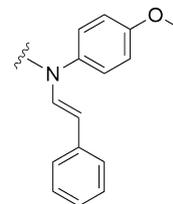
Schi-38-058 (119) R = OMe
66 %



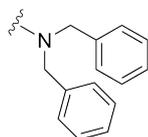
Schi-38-059 (122) R = OMe
52 %



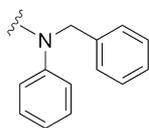
Schi-38-060 (123) R = OMe
56 %



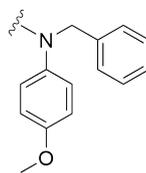
Schi-38-061 (121) R = OMe
17 %



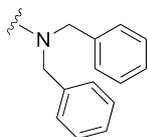
Schi-38-062 (124) R = H
17 %



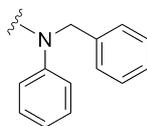
Schi-38-063 (125) R = H
27 %



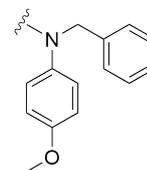
Schi-38-064 (126) R = H
32 %



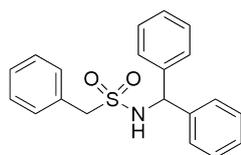
23 %, Schi-38-070 (127) R = NO₂
quant., Schi-38-071 (128) R = NH₂



40 %, Schi-38-066 (129) R = NO₂
95 %, Schi-38-067 (130) R = NH₂



27 %, Schi-38-068 (131) R = NO₂
quant., Schi-38-069 (132) R = NH₂



Schi-38-065 (133)
37 %

Abbildung 38: Dargestellte propellerartigen Sulfonamide und ihre Ausbeuten.

3.4.4 Biologische Ergebnisse der propellerartigen Sulfonamide

Die biologische Testung erfolgte zunächst mittels eines WST-1-Assays zur Untersuchung der Zytotoxizität. Waren die Verbindungen bereits bei einer Konzentration von 100 μM nicht zytotoxisch, wurden sie nicht weiter im DLA auf ihre inhibitorische Wirkung getestet. Dies war für die Verbindungen **Schl-38-063** und **Schl-38-066** der Fall. **Schl-38-064** war ab einer Konzentration von 10 μM , **Schl-38-062** und **Schl-38-065** bei einer Konzentration von 100 μM zytotoxisch. **Schl-38-059** war bei einer Konzentration von 10 μM nicht löslich und zytotoxisch. Anschließend wurden alle Verbindungen bei ihrer nicht zytotoxischen Konzentration im DLA untersucht. Die Ergebnisse des DLA sind in Abbildung 39 dargestellt.

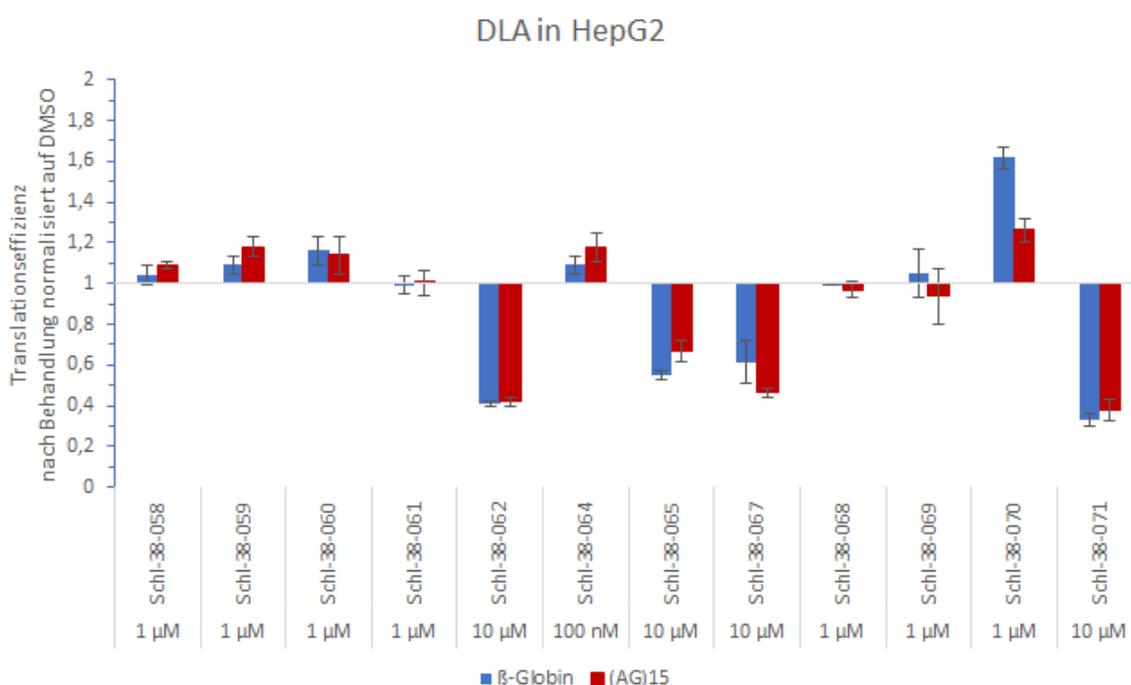


Abbildung 39: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene propellerartige Sulfonamide zusammengefasst.

Die Verbindungen **Schl-38-058** bis **Schl-38-061**, die einen 4-Methoxy-Substituenten am Benzolsulfonamid und unterschiedliche Reste am *N*-Phenylrest trugen, konnten nur bei einer Konzentration von 1 μM im DLA getestet werden, da sie bei höheren Konzentrationen zy-

totoxisch waren. Alle vier Verbindungen zeigten hier keinen inhibitorischen Effekt auf die Translation. Bei den übrigen vier Verbindungen konnten lediglich ein relativ starker unspezifischer Effekt beobachtet werden: **Schl-38-062** (58%), **Schl-38-065** (33%), **Schl-38-067** (53%) und **Schl-38-071** (62%). Bei diesen Verbindungen handelte es sich um diejenigen mit einem Benzhydrylamid-, Dibenzylamid- und einem *N*-Benzylanilid-Rest, wobei die Letzteren eine Aminogruppe in *para*-Position am Benzolsulfonamid trugen, während die Verbindungen mit einem Benzhydrylamid- oder Dibenzylamid-Rest ohne einen weiteren Substituenten vorlagen. Propellerartige Sulfonamide mit einem *N*-Benzyl-4-methoxyanilid-Rest hatten überhaupt keinen Effekt auf die Translation (**Schl-38-059**, **Schl-38-064**, **Schl-38-068**, **Schl-38-069**). Auffällig war in dieser Serie noch **Schl-38-070**, das über einen Dibenzylamid-Rest sowie eine Nitrogruppe am Benzolsulfonamid verfügte. Hier war eine starke Hochregulation der Translation des β -Globins von 62 % zu beobachten. Interessant ist, dass die analoge Verbindung **Schl-38-071** mit einer Aminogruppe anstelle der Nitrogruppe dagegen einen starken unspezifischen Hemmeffekt hervorrief. Zusammenfassend ist festzustellen, dass in der Stoffklasse der propellerartigen Sulfonamide keine Substanz erhalten wurde, die die gesuchte spezifische Hemmung der Translationseffizienz aufwies. In einigen Fällen wurde lediglich ein unspezifischer Effekt beobachtet.

3.5 Propellerartige Carbonsäureamide

3.5.1 Motivation und Idee

Im Laufe dieser Arbeit wurden zehn propellerartige Carbonsäureamide synthetisiert, die wie die propellerartigen Sulfonamide den Bindungsmodus von RocA nachahmen sollen. Hiermit sollte die Frage geklärt werden, ob das Sulfonamid als funktionelle Gruppe am Verzweigungspunkt eines potentiellen Inhibitors stehen muss. In dieser Stoffklasse sollten unterschiedliche Abstände zwischen den Arylresten und dem Carbonsäureamid-Stickstoff sowie eine Modifikation am Benzoylrest des Carbonsäureamids durch verschiedene Arylreste erfolgen.

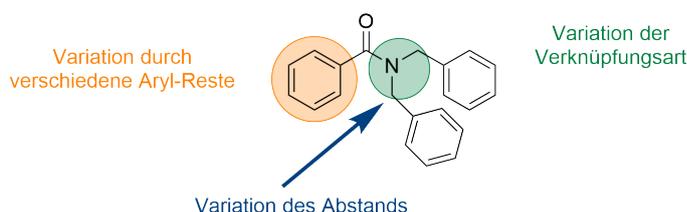
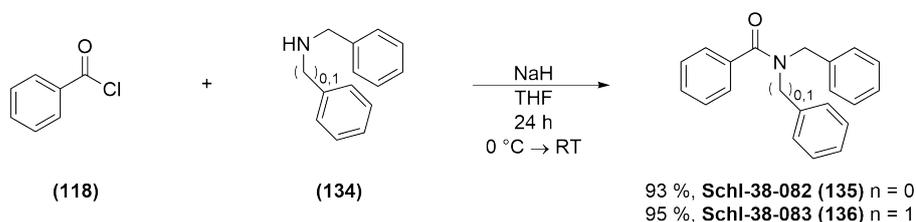


Abbildung 40: Modifikationen an der Struktur der propellerartigen Carbonsäureamide.

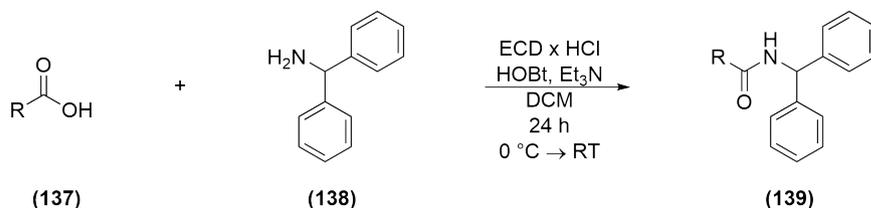
3.5.2 Synthese der propellerartigen Carbonsäureamide

Die Darstellung der propellerartigen Carbonsäureamide erfolgte in einer einstufigen Synthese. Hier wurden die Abstände zwischen Arylrest und Carbonsäureamid-Stickstoff variiert. Die Verbindungen **Schl-38-082** und **Schl-38-083** wurden über eine nucleophile Substitution aus dem Benzoylchlorid (**118**) und dem entsprechenden sekundären Amin (**134**) (Schema 10) hergestellt. Die Synthese verlief problemlos und lieferte sehr gute Ausbeuten von 93 % und 95 %.



Schema 10: Synthese der propellerartigen Carbonsäureamide aus dem Carbonsäurechlorid.

Bei den folgenden Derivaten wurde das Benzhydrylamin (**138**), das im Vergleich zu den beiden oben genannten Verbindungen über eine leicht veränderte Geometrie verfügt, genutzt. Die Darstellung der Verbindungen **Schl-38-084** bis **Schl-38-091** gelang mithilfe einer Kupplungsreaktion aus Benzhydrylamin und den entsprechenden Säuren (Schema 11). Als Kupplungsreagenz wurde EDC, HOBt und als Base Triethylamin verwendet. Die Synthese der propeller-



Schema 11: Synthese der propellerartigen Carbonsäureamide aus der Carbonsäure.

artigen Carbonsäureamide verlief relativ problemlos und mit niedrigen bis zu guten Ausbeuten (Abbildung 41). Hierbei sind vor allem die geringen Ausbeuten mit dem *N*-Phthaloylglycin-Rest (**Schl-38-089**) und dem 1*H*-Indol-5-carbonsäure-Rest (**Schl-38-087**) auffällig. Die geringe Ausbeute bei Verbindung **Schl-38-087** kann auf die Reinigung zurückgeführt werden, denn die Hälfte der Fraktionen enthielt eine nicht abtrennbare Verunreinigung.

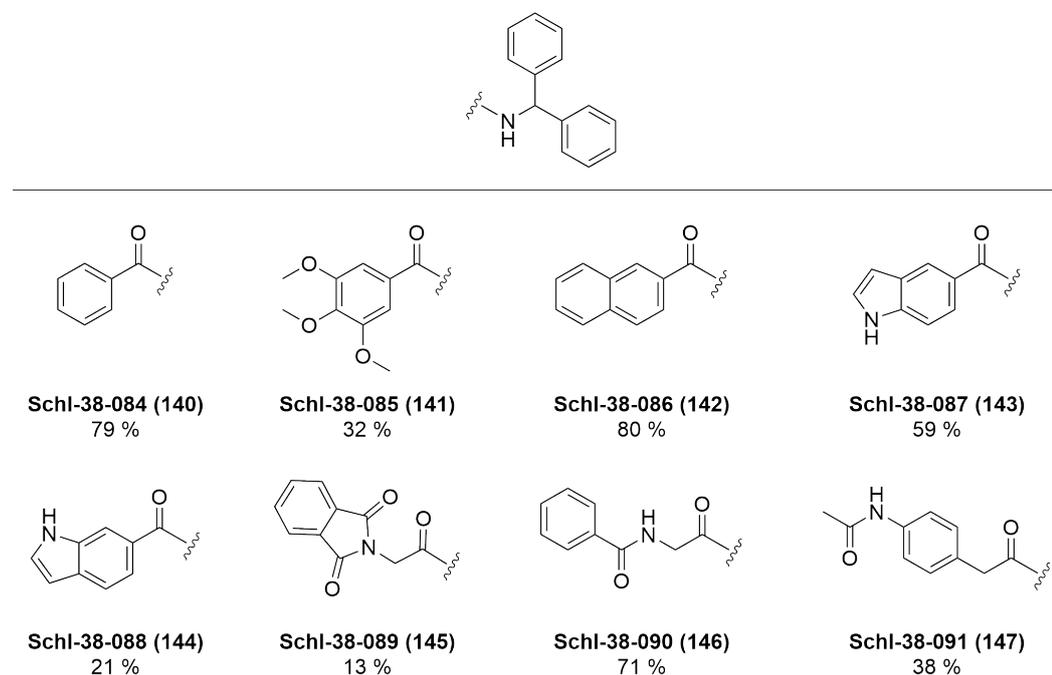


Abbildung 41: Dargestellte propellerartige Carbonsäureamide und ihre Ausbeuten.

3.5.3 Biologische Ergebnisse der propellerartigen Carbonsäureamide

Die biologischen Testungen der propellerartigen Carbonsäureamide erfolgte analog zu den der anderen Stoffklassen mittels eines WST-1-Assay und eines DLA. Alle Verbindungen wurden bei einer Konzentration von 1 μM bzw. 10 μM im DLA getestet (Abbildung 42). **Schl-38-089** bis **Schl-38-091** hatten bei einer Konzentration von 100 μM Probleme mit der Löslichkeit und waren bei dieser Konzentration leicht zytotoxisch. Alle anderen propellerartigen Carbonsäureamide wiesen eine Zytotoxizität bei einer Konzentration von 100 μM .

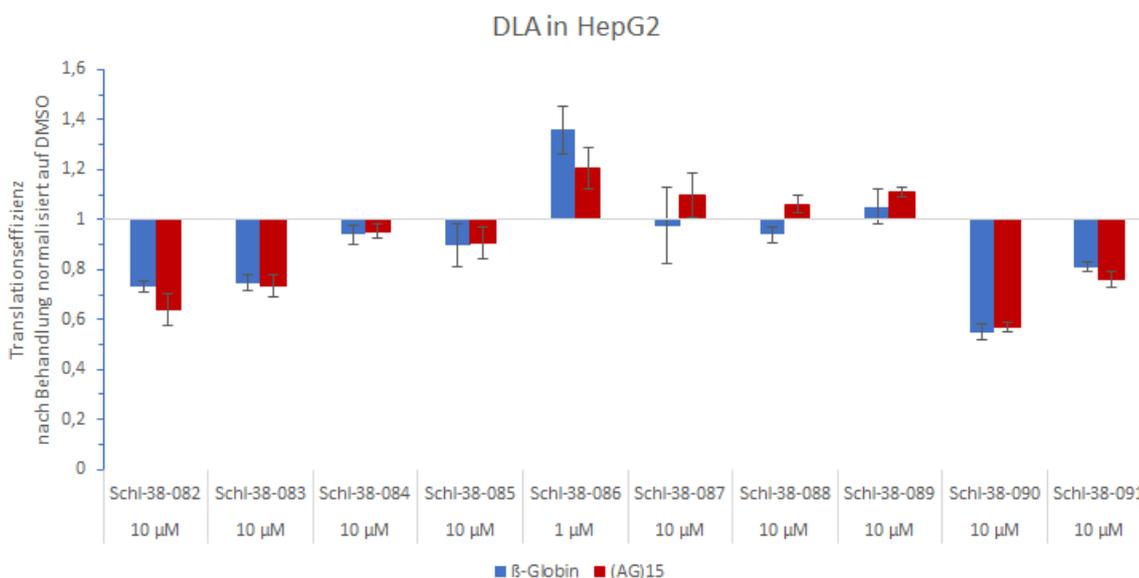


Abbildung 42: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene propellerartige Carbonsäureamide zusammengefasst.

Die zwei propellerartigen Carbonsäureamide mit Dibenzylamin- (**Schl-38-082**) und *N*-Benzylanilin-Rest (**Schl-38-083**) zeigten im DLA einen leichten inhibitorischen Effekt auf die Translation. Bei den anderen Verbindungen mit einem Benzhydryl-Rest war überwiegend kein Effekt auf die Translationseffizienz zu beobachten. Nur bei **Schl-38-090** und **Schl-38-091** waren unspezifische inhibitorische Effekte zu beobachten. Dabei war der Effekt bei **Schl-38-090** mit 43 % deutlich ausgeprägter als der bei **Schl-38-091** mit 24 %.

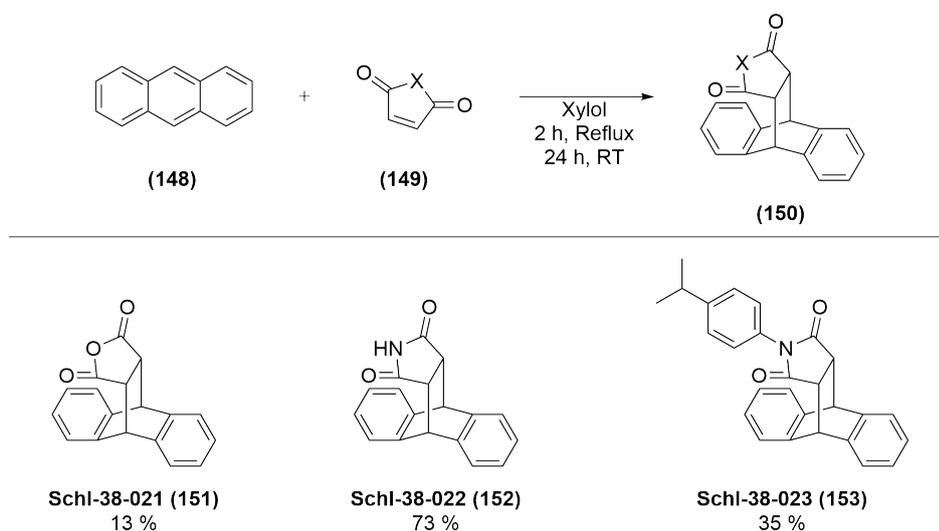
3.6 DIELS-ALDER-Addukte

3.6.1 Motivation und Idee

Die Idee für diese Stoffklasse der DIELS-ALDER-Addukte war die Rocaglate in ihrer rigiden Struktur und Geometrie zu imitieren. So wurden drei rigide DIELS-ALDER-Addukte dargestellt, die zunächst erst im biologischen Test evaluiert werden sollten, bevor weitreichende Modifikationen vorgenommen würden.

3.6.2 Synthese der DIELS-ALDER-Addukte

Die Darstellung der DIELS-ALDER-Addukte erfolgte in einer einstufigen Synthese aus dem Dienophil, dem Antracen, und den entsprechenden Dienen (Schema 12). Bei der DIELS-ALDER-Reaktion handelt es sich um eine [4+2]-Cycloaddition, die unter Wärmeeinfluss erfolgt.



Schema 12: Synthese der DIELS-ALDER-Addukte.

Es wurden drei DIELS-ALDER-Addukte mit unterschiedlichem Strukturelement X dargestellt. Dabei handelte es sich um einen Sauerstoff und einem nicht weiter substituierten Stickstoff. Im dritten Fall wurde mit einem Isopropylphenyl-Substituenten am Stickstoff ein deutlich größeres Molekül erzeugt. Die Synthesen lieferten Ausbeuten im niedrigen Bereich für die Verbindungen **Schl-38-021** und **Schl-38-023**. Für **Schl-38-022** konnte eine gute Ausbeute von 73 % erhalten werden.

3.6.3 Biologische Ergebnisse der DIELS-ALDER-Addukte

Die drei synthetisierten DIELS-ALDER-Addukte waren im WST-1-Assay bei den getesteten Konzentrationen von 100 nM, 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M nicht zytotoxisch. Die Verbindungen waren bei einer Konzentration von 100 μ M allerdings nur schwer löslich. So konnten die Verbindungen im DLA bei den drei niedrigen Konzentrationen untersucht werden. Es zeigte sich jedoch eine starke Hochregulation der Translation von β -Globin und keine signifikante Auswirkung auf die von PIM1. In Abbildung 43 sind die Ergebnisse des DLA gezeigt.

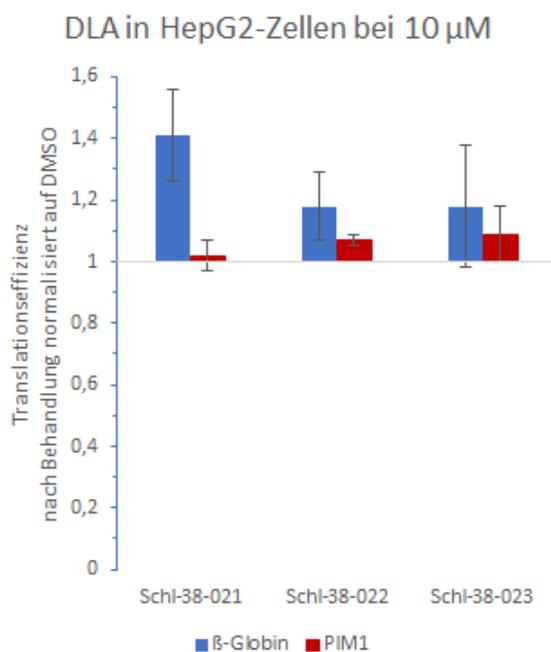


Abbildung 43: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen der DIELS-ALDER-Addukte bei einer Konzentration von 10 μ M.

Neben dem DLA wurde mit **Schl-38-023** auch ein TSA durchgeführt. Hier konnte jedoch eine Temperaturniedrigung von -1.34 $^{\circ}$ C beobachtet werden. Dies deutet auf eine Destabilisierung des Helikase-RNA-Komplex hin, die durch eine Erniedrigung der Schmelztemperatur ausgedrückt wird. Aufgrund dieser biologischen Ergebnisse wurde die Stoffklasse der DIELS-ALDER-Addukte mangels inhibitorischem Effekt als potentielle eIF4A-Inhibitoren verworfen.

3.7 Rhodanine

3.7.1 Allolaurinterol-Projekt

Die Idee zur Synthese der Rhodanine entstand nach der eingehenden Analyse verschiedener Naturstoffe, die als eIF4A-Inhibitoren wirken, und zwar zu einem Zeitpunkt, an dem die Kristallstruktur der Helikase noch nicht veröffentlicht war. Es handelt sich folglich um einen Liganden-basierten Ansatz, in dem verschiedene eIF4A-Inhibitoren betrachtet und auf ihre Gemeinsamkeit hin untersucht wurden (Abbildung 44). Silvestrol, RocA und das synthetische Derivat CR-31-B(-) gehören zu den Rocaglaten.^{[66],[67],[68]} Bei Hippuristanol handelt es sich ebenfalls um einen eIF4A-Inhibitor, der im Gegensatz zu den Rocaglaten jedoch über einen anderen Hemmmechanismus verfügt und die Interaktion von eIF4A und der RNA verhindert.^[69] Allolaurinterol gehört zu der Klasse der maritimen Sesquiterpene, die aus roten Algen der Spezies *Laurencia* gewonnen werden.^[70] Es besitzt eine antibakterielle Wirkung gegen Gram-positive Bakterien sowie einen inhibitorischen Effekt auf die eIF4A ATPase im niedrigen μM Bereich.^{[71],[72]}

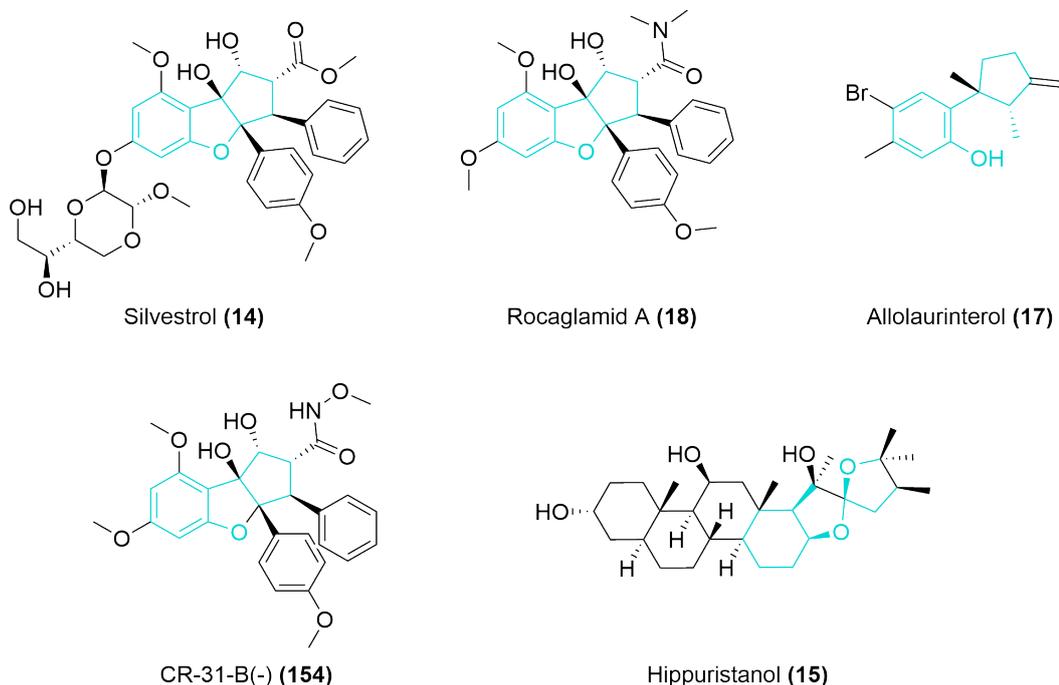
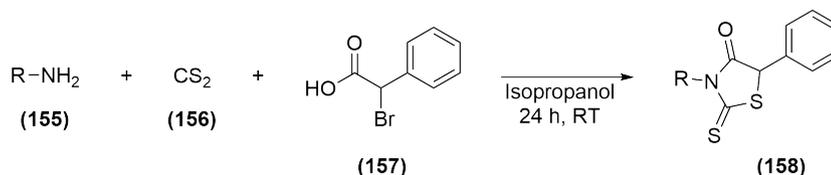


Abbildung 44: Bekannte Naturstoffe, die als eIF4A-Inhibitoren wirken.^[52] In türkis sind die Struktur motive markiert, die bei allen Verbindungen ähnlich sind.

Wie in Abbildung 44 veranschaulicht, haben alle in der Natur vorkommenden eIF4A-Inhibitoren einen ähnlichen Kern (türkis markiert), der aus drei Ringen besteht. Obwohl Allolaurinterol nur zwei Ringe besitzt, hat es durch deren Verknüpfung und die Hydroxygruppe eine vergleichbare Geometrie. Dies ist die Basis, auf der die Allolaurinterol-Struktur als Vorlage für das Design der Rhodanine ausgewählt wurde. So wurden im Rahmen dieser Arbeit sieben Rhodanine mit unterschiedlichen Abständen und Rigiditäten synthetisiert.

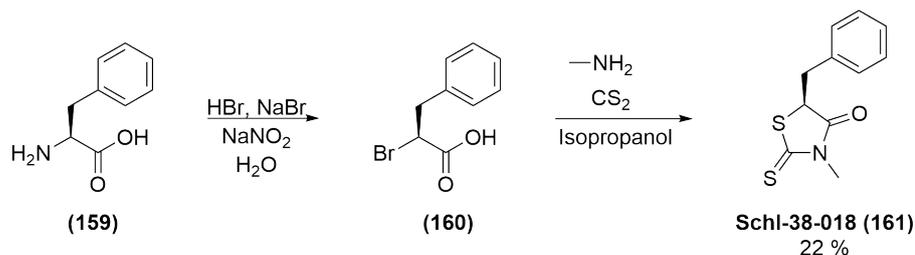
3.7.2 Synthese der Rhodanine

Die Darstellung der Rhodanine erfolgte nach der von JACOBINE und POSNER publizierten Vorschrift.^[73] Es handelt sich um eine drei-Komponenten Reaktion aus einem Amin (**155**), der α -Bromphenylelessigsäure (**157**) und Kohlendisulfid (**156**) in Isopropanol (Schema 13).



Schema 13: Synthese der Rhodanine in einer drei-Komponenten Reaktion.

Für die Synthese eines Rhodanins mit einem 5-Benzylrest musste die Synthese des α -Bromids (**160**) aus Phenylalanin (**159**) erfolgen (Schema 14).

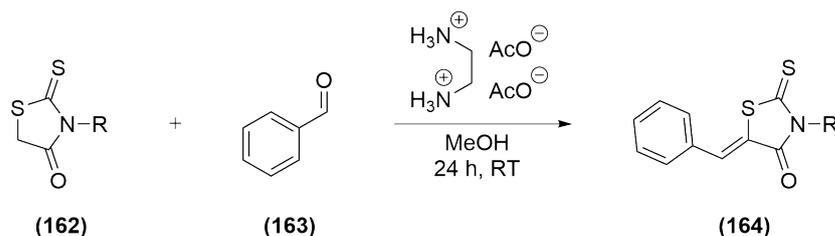


Schema 14: Synthese der Rhodanine: (1) Bromierung (2) Drei-Komponenten-Reaktion.

Die Bromierung des Phenylalanins erfolgte in Anlehnung an die von KUDELKO publizierte Synthesevorschrift.^[74] Anschließend wurde das Bromid direkt und ohne weitere Analytik weiter umgesetzt. Das gewünschte Produkt konnte nur mit einer niedrigen Ausbeute von 22 %

gewonnen werden, da es mehrfach säulenchromatographisch gereinigt werden musste.

Im folgenden Schema 15 ist die Synthese einer Rhodanin-Serie gezeigt, die eine Doppelbindung (*Z*-Isomer) an der 5-Position des Rhodanins besitzt. Bei der Synthese werden Benzaldehyd (**163**), das entsprechende Rhodanin (**162**) und Ethylendiamin Diacetat (EDA) zu den gewünschten Verbindungen umgesetzt. Die Reinigung bestand lediglich in einer Umkristallisation aus Methanol.



Schema 15: Synthese der Rhodanine mithilfe von EDA.

Abbildung 45 fasst die Ausbeuten der Zielverbindungen aus den oben beschriebenen Synthesen zusammen. Alle Rhodanine konnten mit guten Ausbeuten erhalten werden. Es sollte zunächst nur eine Handvoll Verbindungen dargestellt werden, um diese exemplarisch in den biologischen Tests zu untersuchen. Bei den Rhodaninen ohne Doppelbindung wurden zum einen die Länge des Rests R und zum anderen die elektronischen Eigenschaften durch den Amino-Rest variiert. Bei den Rhodaninen mit Doppelbindung wurden ein Amino- und ein längerer Carbonsäurerest eingebaut.

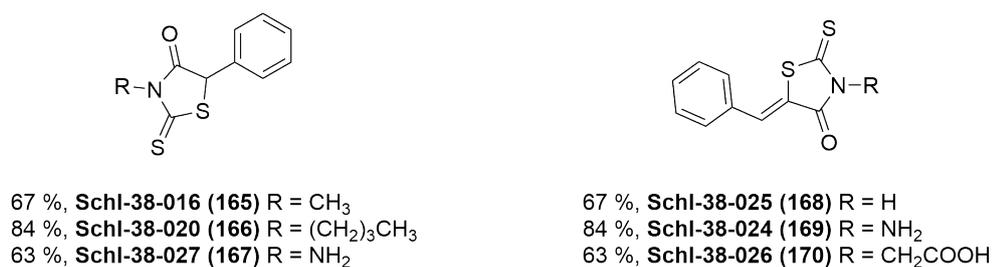


Abbildung 45: Dargestellte Rhodanine und ihre Ausbeuten.

3.7.3 Biologische Ergebnisse der Rhodanine

Die biologische Testung der Rhodanine erfolgte mit dem DLA und einem vorangegangenen WST-1-Assay zur Untersuchung der Zytotoxizität. Dabei waren zwei Rhodanine **Schl-38-024** und **Schl-38-026** bei einer Konzentration von 100 μM nicht löslich, obwohl sie die polare Amino- bzw. Carboxylgruppe trugen. Nach der Evaluation des WST-1-Assays wurden die Rhodanine bei einer Konzentration von 1 μM bzw. 10 μM im DLA getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 46 gezeigt.

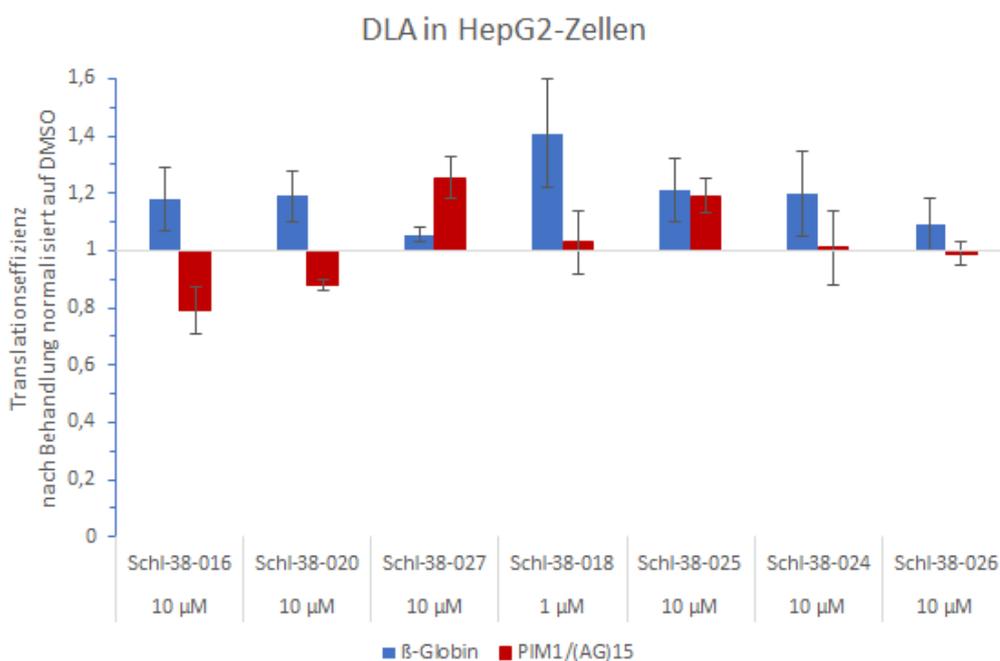


Abbildung 46: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene Rhodanine zusammengefasst.

Aus den Testergebnissen des DLA geht klar hervor, dass die Rhodanine nicht als eIF4A-Inhibitoren fungieren. Alle Verbindungen zeigten keinen signifikanten inhibitorischen Effekt auf die Translation, wobei die Mehrzahl der Effekte in einer Hochregulation bestand. Eine Ausnahme war die Verbindung **Schl-38-016**, da hier eine schwache Hemmung von 19 % bei einer Konzentration von 10 μM zu beobachten ist. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Synthese weiterer Rhodanine für die weitere Suche nach potentiellen eIF4A-Inhibitoren nicht sinnvoll ist.

3.8 Struktur-basiertes Design

Die Struktur-basierte Wirkstoffentwicklung setzt das Vorhandensein einer Kristallstruktur oder eines Homologiemodells des Zielproteins voraus. Ist die Kristallstruktur des Zielproteins gemeinsam mit einem bekannten Inhibitor vorhanden, können in diesem Fall gezielte Modifikationen an der Molekülstruktur zur Verbesserung der Aktivität, der Löslichkeit und/oder Zytotoxizität vorgenommen werden. Durch sich wiederholende Zyklen der Entwicklung, Synthese und Testung können so Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR: *structure activity relationship*) untersucht werden. Der zweite Ansatzpunkt wäre ein *de novo* Design, in dem ein neuartiger Ligand für die Bindetasche entworfen wird. Dieser sollte nicht nur eine gute Ausfüllung der Bindetasche gewährleisten, sondern auch in der Lage sein, möglichst viele bindende Wechselwirkungen auszubilden, z.B. in Form von Wasserstoffbrücken, π - π -Wechselwirkungen oder hydrophoben Wechselwirkungen, um nur die wichtigsten zu nennen.^{[75],[76]}

3.8.1 Kristallstruktur der humanen RNA-Helikase eIF4A

Die Kristallstruktur der humanen RNA-Helikase eIF4A zusammen mit dem Naturstoff Rocaglamid A (RocA, siehe Kapitel 1.8.1), gewonnen aus Pflanzen der Gattung der *Aglaia*, wurde erstmals 2019 von IWASAKI *et al* publiziert (PDB: 5ZC9)^[66]. Die Helikase konnte in ihrer geschlossenen Form mit dem nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogon AMP-PNP, RocA und einer Polypurin-RNA kristallisiert und deren Struktur mit einer Auflösung von 2 Å aufgeklärt werden. Bei RocA handelt es sich um einen bekannten eIF4A-Inhibitor, der interfacial an die Bindetasche bindet. Die Hemmwirkung wird durch das Festklemmen der RNA an eIF4A (*RNA clamping*) erzeugt, indem RocA hierbei zwischen die beiden Basen A7 und G8 der RNA insertiert.^[66]

In Anlehnung an die von IWASAKI *et al* verwendete Bezeichnung der Ringe A, B und C des RocA sollen von nun an die von diesen Strukturelementen adressierten Teilbereiche der Bindetasche als Subtaschen A, B und C bezeichnet werden. In Abbildung 47 ist die Kristallstruktur der humanen Helikase eIF4A mit der Polypurin-RNA gezeigt. Die Bindetasche kann hierbei in die Subtaschen A, B und C eingeteilt werden.

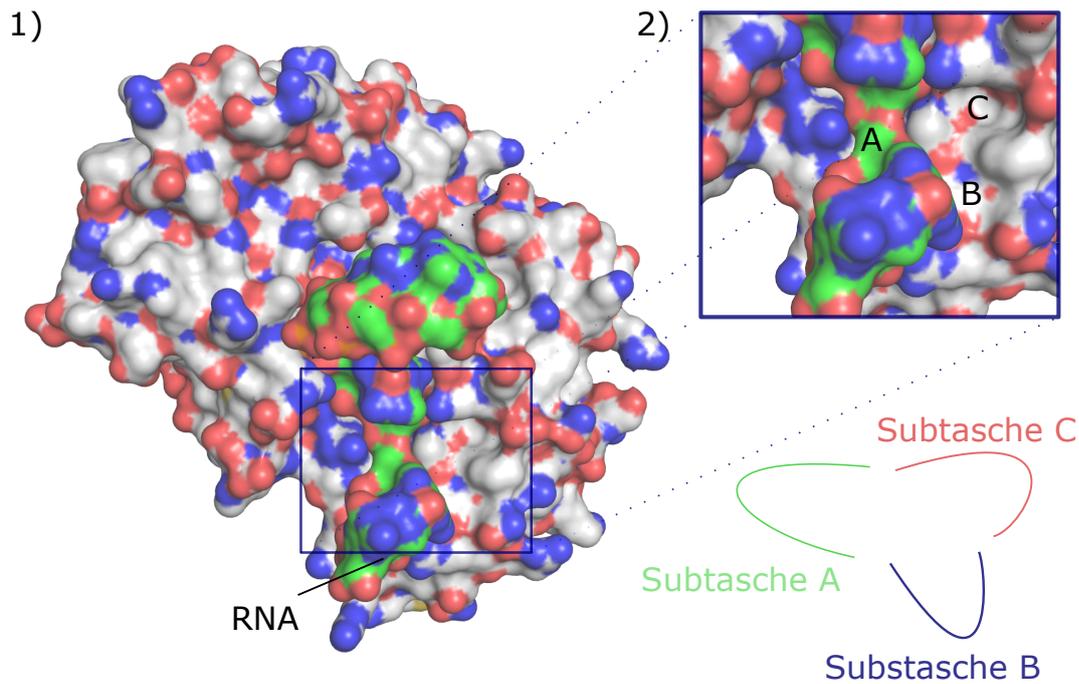


Abbildung 47: (1) Kristallstruktur der humanen DEAD-Box Helikase eIF4A (grau) mit einer Polypurin-RNA (grün) (PDB: 5ZC9)^[66]. (2) Vergrößert abgebildet ist die Bindetasche mit einer schematischen Darstellung der Subtaschen A (grün), B (blau) und C (rot).

Der klammerartige Hemmeffekt wird durch unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen der Helikase, der RNA und dem Inhibitor erreicht. In Abbildung 48a sind alle Wechselwirkungen und in Abbildung 48b die Oberfläche der Bindetasche dargestellt. Zum einen gibt es starke π - π - und CH- π -Wechselwirkungen zwischen RocA und den Purinbasen A7 und G8 der RNA sowie Phe163 und Gln195. Zum anderen bildet RocA mit G8 und Gln195 zwei Wasserstoffbrückenbindungen aus, die den quartären Komplex stabilisieren. RocA enthält wichtige Strukturelemente bestehend aus drei aromatischen Ringen, die im Folgenden entsprechend ihrer Positionierung in den Subtaschen als Strukturelemente A, B und C bezeichnet werden. Die Strukturelemente A und B sind parallel zu den Basen A7 und G8 positioniert. Das Strukturelement C liegt zwischen Phe163 und Gln195 und ist leicht versetzt zum Phe163-Ring positioniert. Würden die Purinbasen in den Positionen durch Pyrimidinbasen ausgetauscht werden, gingen die starken π - π -Wechselwirkungen sowie die Wasserstoffbrücke verloren, sodass RocA nicht mehr binden könnte. Für RocA liegt folglich eine Selektivität gegenüber polypurinen RNA-Sequenzen vor.^[66]

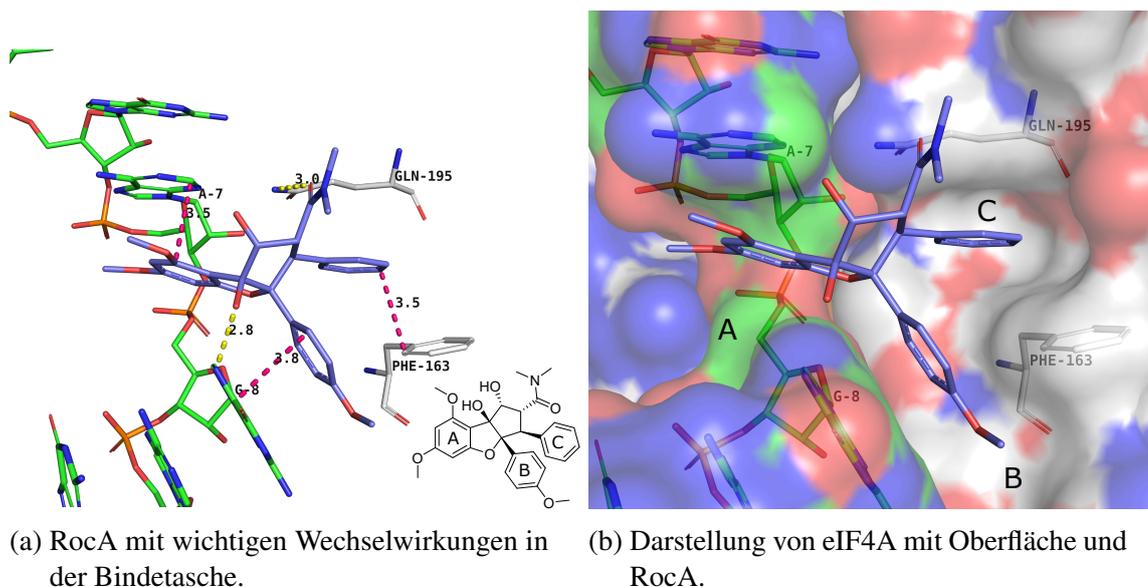
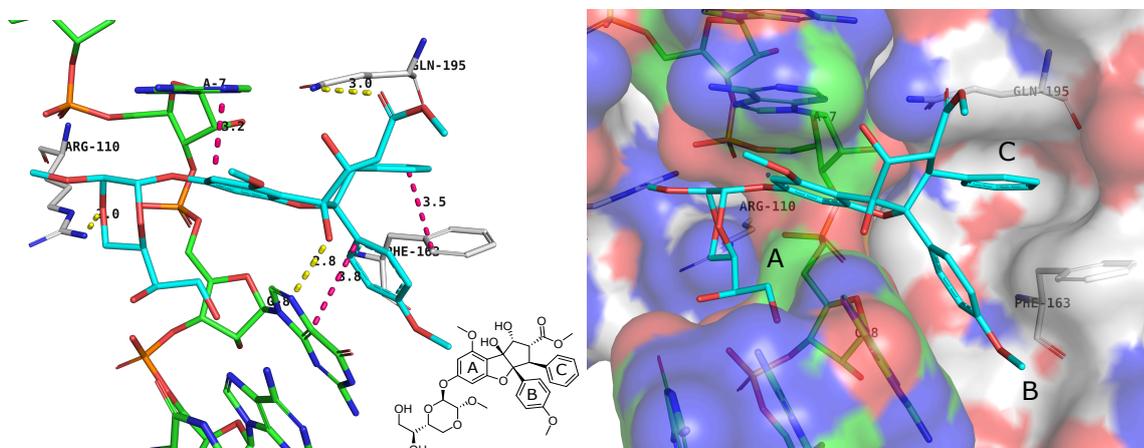


Abbildung 48: Kristallstruktur der humanen RNA-Helikase (PDB:5ZC9)^[66] mit RocA (blau): Die RNA-Basen sind in grün und die Aminosäuren der Helikase in grau dargestellt. (a) RocA mit den zwei Wasserstoffbrückenbindungen in gelb (3.0 Å zu Gln195; 2.8 Å zu G8) und π - π -WW in magenta (3.5 Å zu Phe163; 3.8 Å zu G8; 3.5 Å zu A7). (b) RocA in der Bindetasche: Die Strukturelemente A und B stehen nahezu parallel zu den Basen A7 und G8. Der Ring A agiert als RNA-Klammer.

3.8.2 Molekulares Docking von Silvestrol

In Kooperation mit CRYSTALS FIRST konnte die Dockingpose von Silvestrol (Abbildung 49b), einem aus der Pflanze *Aglaia foveolata* gewonnenen Naturstoff, erhalten werden. Bei Silvestrol handelt es sich um einen hoch effizienten, nicht-toxischen und spezifischen eIF4A-Inhibitor, der im niedrigen nanomolaren Bereich wirkt.^[77] Silvestrol gehört wie RocA zu den Rocaglamiden und ähnelt RocA nahezu vollständig in seinen drei Strukturelementen bestehend aus den aromatischen Ringen A, B und C, besitzt jedoch anstatt des Amid-Arms einen Ester und in der Subtasche A einen zusätzlichen Dioxanring. Durch diesen zusätzlichen Dioxanring kann zum Beispiel eine Wasserstoffbrücke zu dem Arg110 gebildet werden. Da eine gewisse Flexibilität des Dioxanrings nicht ausgeschlossen ist, könnten auch weitere Wechselwirkungen zu den anderen Arginen (Arg282 und Arg311) in diesem Bereich bestehen. Im Vergleich mit RocA liegt Silvestrol darüber hinaus komplett über der RNA und fixiert diese fest an die Helikase. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die Polypurin-RNA un-

spezifische Hemmwirkung von Silvestrol.^{[64],[67]} Die Wechselwirkungen von Silvestrol in der eIF4A-Bindetasche sind in Abbildung 49a gezeigt. In Abbildung 49b ist die Oberfläche der Bindetasche zur Veranschaulichung dargestellt.



(a) Silvestrol mit allen wichtigen Wechselwirkungen in der Bindetasche.

(b) Darstellung von eIF4A mit Oberfläche und Silvestrol.

Abbildung 49: Dockingpose von Silvestrol (türkis) in der Kristallstruktur der humanen Helikase (PDB:5ZC9):^[66] Die RNA-Basen sind in grün und die Aminosäuren der Helikase in grau dargestellt. (a) Silvestrol mit den zwei Wasserstoffbrückenbindungen in gelb (3.0 Å zu Gln195; 2.8 Å zu G8; 2.0 Å zu Arg110) und π - π -WW in magenta (3.5 Å zu Phe163; 3.8 Å zu G8; 3.2 Å zu A7). (b) Silvestrol in der Bindetasche: Die Ringe A und B stehen nahezu parallel zu den Basen A7 und G8. Der Ring A agiert als RNA-Klammer und der Dioxanring verstärkt diesen Effekt.

3.8.3 *in silico* Docking

Als *in silico* Methode zur Bewertung von kleinen Molekülen auf ihre Eignung als potentielle eIF4A-Inhibitoren wurde molekulares Docking mit dem Programm *GOLD*^[78] genutzt. Die von IWASAKI *et al* publizierte Kristallstruktur mit der PDB: 5ZC9^[66] wurde verwendet. Zur Vorbereitung der Proteinstruktur erfolgte eine Protonierung des Proteins und die Kristallwassermoleküle sowie das ATP-Analogon AMP-PNP wurden entfernt. Die Bindetasche wurde durch den Liganden RocA definiert. Als Scoring Funktion wurde ASP (*Astex Statistical Potential*), ein Atom-Atom-Potential, das aus Datenbanken mit Protein-Ligand-Komplexen abgeleitet wird, genutzt.^[79] Die 3D-Konformationen der Liganden wurden vor dem Docking mit dem

Programm DATA WARRIOR V5.5.0^[80] oder CHEM3D 19.1^[81] erzeugt und energieminiert. Für jeden Liganden wurden die fünf Dockingpositionen mit dem höchsten Scoring-Ergebnis durch das Dockingprogramm ausgegeben. Die Visualisierung der Dockingposen erfolgte mit PyMOL^[82]. Die Dockingposen wurden visuell unter den im Folgenden erläuterten Kriterien ausgewertet. Zum einen war die Adressierung der zwei Basen (A7, G8) und des Phe163 mit π - π -Wechselwirkungen entscheidend. Zum anderen war es vorteilhaft, dass die Wasserstoffbrücke zum Gln195 erhalten bleibt. Ein weiterer wichtiger Aspekt war, dass die Bindungswinkel der Liganden in den ausgewerteten Dockingposen chemisch betrachtet sinnvoll waren. So sollten zum Beispiel Amid-Bindungen in der begünstigten *trans*-Konfiguration vorliegen und eine planare Anordnung besitzen, um ihren partiellen Doppelbindungscharakter zu berücksichtigen.^[83] Unter diesen Gesichtspunkten wurden die Abstände zwischen dem Liganden und der Helikase vermessen, um potentielle Wechselwirkungen beurteilen zu können. Bei den π - π -Wechselwirkungen wird ein Abstand von 3.4-3.6 Å für zwei parallele Aromaten,^[84] für Wasserstoffbrückenbindungen ein Abstand von 2.4-3.5 Å^[85] angenommen.

Es wurden verschiedene Molekül-Bibliotheken mit gezielten Modifikationen der unterschiedlichen Stoffklassen entworfen und mittels molekularem Docking untersucht und ausgewertet. Die Bibliotheken variierten in ihrer Größe und wurden unterschiedlich genutzt. Anfangs wurden große Molekül-Bibliotheken erstellt und gescreent, um geeignete Verbindungen für die Synthese zu identifizieren. Mit dem Fortschreiten der Entwicklung und der biologischen Evaluation wurden eher kleinere Bibliotheken gedockt, um gezielte Ideen betreffend potentiell erfolgversprechende Verbindungen auf ihre Sinnhaftigkeit zu überprüfen.

3.9 *N*-Acylaminosäureamide

3.9.1 Idee und Entwicklung der *N*-Acylaminosäureamide

Die Arbeit mit der Stoffklasse der *N*-Acylaminosäureamide war ein Schwerpunkt dieser Dissertation. Die Moleküle wurden gezielt nach den Ansprüchen der Bindetasche entworfen. Alle drei Subtaschen A, B und C sollten durch aromatische Ringe adressiert werden, um π - π -Wechselwirkungen mit den Basen A7 und G8 sowie mit Phe163 eingehen zu können. Des Weiteren sollten diese drei Reste eine einfache Verknüpfung aufweisen. Dazu wurden amidische Gruppen gewählt. Von großer Relevanz bei der Wahl der ersten Struktur motive war eine gute Zugänglichkeit und einfache Synthese, weil diese Aspekte in der medizinischen Chemie entscheidend für die weiteren Schritte in der Wirkstoffentwicklung sind. Der Entwicklungsprozess einer geeigneten Molekülstruktur für die Helikase-Bindetasche ist in Abbildung 50 vereinfacht dargestellt.

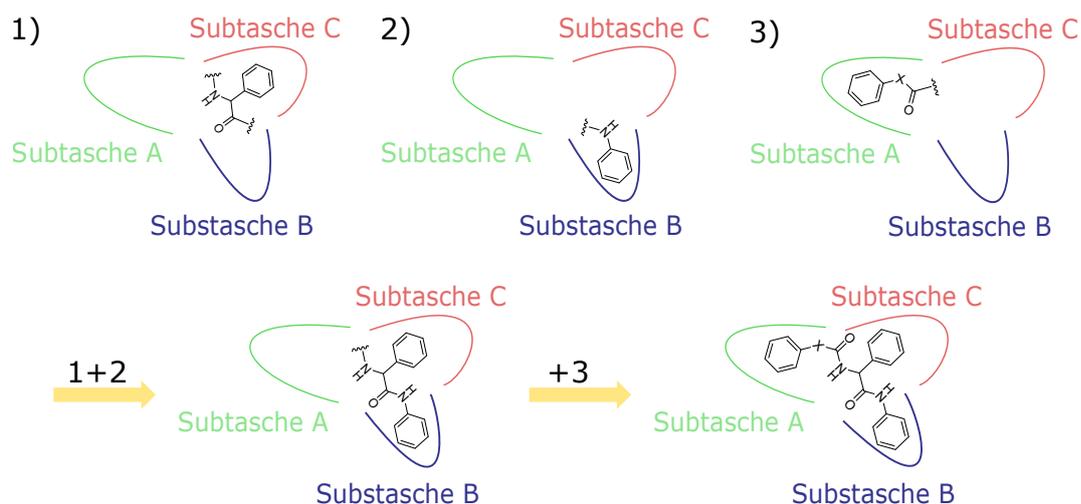


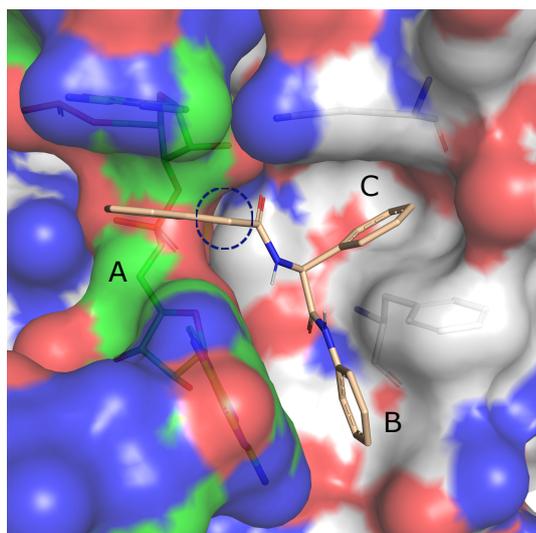
Abbildung 50: Struktur-basiertes Design der *N*-Acylaminosäureamide: Entwurf passender Struktur motive für die Subtaschen A, B und C schematisch dargestellt.

Phenylglycin wurde als Basis ausgewählt, da sein Phenylrest die Subtasche C gut adressieren kann, während seine Carboxylgruppe und seine α -Aminogruppe die räumlich passenden Anknüpfungsstellen für die die Subtaschen A bzw. B adressierenden Strukturelemente liefern. Phenylalanin dagegen wäre aufgrund der zusätzlichen Methylengruppe bereits zu groß für kleine Subtasche C. Zur Adressierung der Subtasche B kann ein Anilin-Derivat amidisch

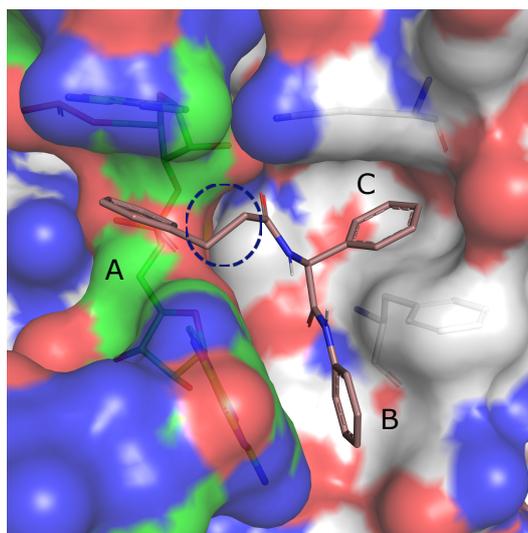
verknüpft werden. Eine andere Möglichkeit wären die größeren Benzyl-Derivate für die Subtasche B. Bei der Subtasche A gestaltete sich die Wahl der Struktur schwieriger, da die Subtasche wesentlich größer ist und somit mehr Spielraum für unterschiedliche Struktur motive bietet. Folglich bestand die erste Herausforderung in der Identifikation eines passenden Struktur motivs für die Subtasche A. Die Anknüpfung als Amid an die α -Aminogruppe der Aminosäure ist synthetisch einfach zu realisieren, gleichzeitig bedient das Amid die Wasserstoffbrückenbindung zu Gln195. Bei dem Struktur motiv für die Subtasche A wurden aromatische Systeme gewählt, die π - π -Wechselwirkungen mit der Purinbase A7 eingehen können. Die Positionierung des Aromaten in der Subtasche A durch ein geeignetes Verknüpfungselement X zum Amid spielt eine wichtige Rolle, um die π - π -Wechselwirkungen optimal zu adressieren und den klammerartigen Effekt von RocA und Silvestrol zu imitieren. Darüber hinaus wurden auch verschiedene Ringsysteme wie das Naphthalin und Indol getestet. Werden alle für die drei Subtaschen entworfenen Strukturelemente miteinander kombiniert und durch eine Amid-Bindung verknüpft, entstehen so die *N*-Acylaminosäureamide. Im nächsten Schritt folgte das molekulare Docking einer gezielten Bibliothek aus unterschiedlichen *N*-Acylaminosäureamiden. Erfüllten die Strukturen die Anforderungen für die Bindetasche, konnte im Anschluss die Synthese und biologische Testung der Verbindungen erfolgen.

Im Rahmen der biologischen Testungen wurden beim DLA zwei vielversprechende *N*-Acylaminosäureamide identifiziert, die einen Phenylelessigsäure- und Phenylpropionsäure-Rest enthielten. Diese beiden Derivate zeigten bei einer Konzentration von 10 μ M einen inhibitorischen Effekt von über 50 % auf die Translation. Die Phenylelessig- und Phenylpropionsäure-Strukturen werden in den folgenden Serien der *N*-Acylaminosäureamide als Grundstruktur bezeichnet. Das etwas rigidere Zimtsäure-Derivat konnte nicht im DLA getestet werden, da es unter den Testbedingungen nicht löslich war. Da diese Struktur dem Phenylpropionsäure-Derivat sehr ähnlich ist und im Docking bei Betrachtung der Ligandenoberfläche eine gute Ausfüllung der Bindetasche vorausgesagt wird, wurde die Zimtsäure-Serie ebenfalls als Grundstruktur mitgenommen. Die Dockingposen der drei Grundstrukturen sind in den Abbildungen 51a (Phenylelessigsäure-Derivat), 51b (Phenylpropionsäure-Derivat) und 51c (Zimtsäure-

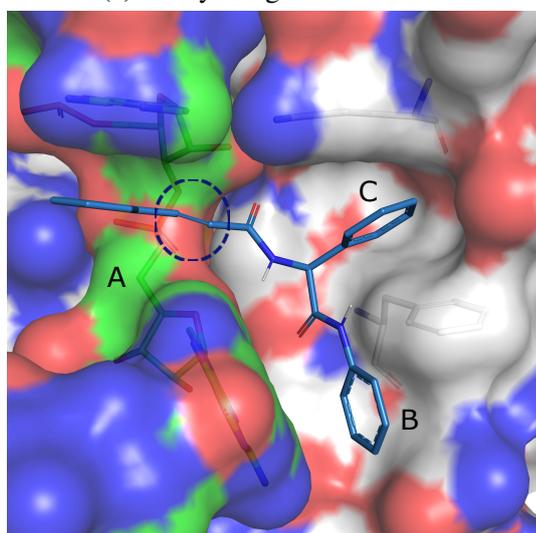
Derivat) dargestellt.



(a) Phenyllessigsäure-Derivat.



(b) Phenylpropionsäure-Derivat.



(c) Zimtsäure-Derivat.

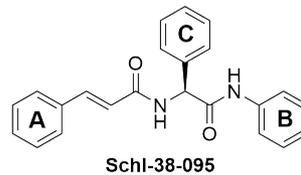
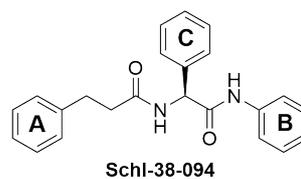
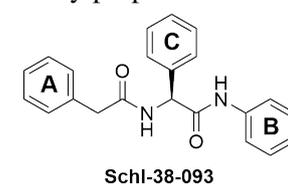


Abbildung 51: Exemplarische Dockingposen der drei Grundstrukturen in der Kristallstruktur des Helikase-Komplexes (PDB:5ZC9)^[66]: (a) Phenyllessig-Derivat (**Schl-38-093** in beige) (b) Phenylpropionsäure-Derivat (**Schl-38-094** in braun) (c) Zimtsäure-Derivat (**Schl-38-095** in blau). Alle drei Derivate zeigen eine gute Ausfüllung der Bindetasche und adressieren die π - π -Wechselwirkungen zu den zwei Basen der RNA und Phe163. Ebenso wird die Wasserstoffbrücke zum Gln195 durch das Carbonsäureamid ausgebildet.

Nach der Identifikation der drei Grundstrukturen (Phenylessig-, Phenylpropionsäure, Zimtsäure-Rest in der Subtasche A) bestand der nächste Schritt des Struktur-basierten Designs in der Modifikation der drei Strukturelemente für die Subtaschen A, B und C. Die Auswahl der dargestellten Verbindungen bei den verschiedenen Modifikationen erfolgte mit Unterstützung von molekularem Docking. Bei den Strukturelementen A und B handelte es sich hauptsächlich um die Optimierung der elektronischen Eigenschaften der aromatischen Ringe. Für das Strukturelement C wurden aliphatische Reste anstelle des Aromaten gewählt. Hierbei konnte die Synthese durch einen Austausch der verwendeten Aminosäure ohne Probleme angepasst werden, sodass sich eine Vielfalt an Möglichkeiten ergab, da prinzipiell jede Aminosäure genutzt werden könnte. Auch die Verwendung nicht-proteinogener Aminosäuren (siehe Kapitel 3.10, S.118) bietet eine große Auswahl an Modifikationen und verleiht der Stoffklasse aufgrund ihrer Wandelbarkeit große Attraktivität. In Abbildung 52 sind alle in dieser Arbeit durchgeführten Modifikationen an der Stoffklasse zusammengefasst.

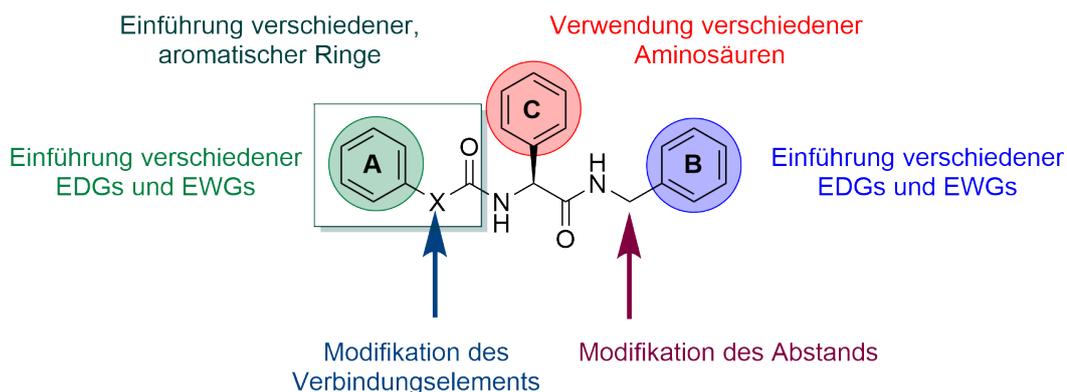
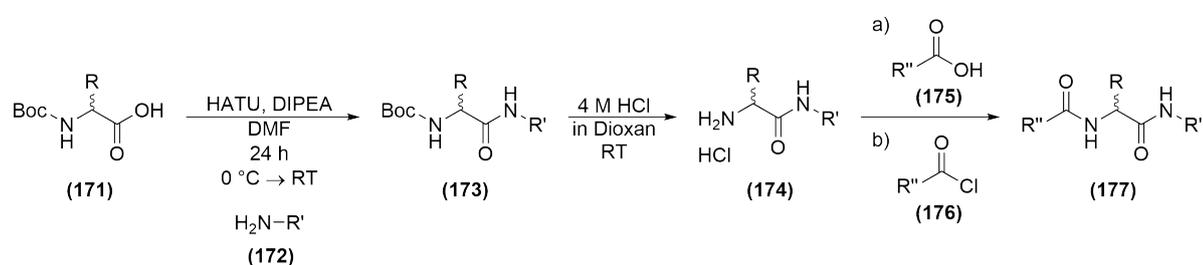


Abbildung 52: Alle in dieser Arbeit durchgeführten Modifikationen an der Stoffklasse der *N*-Acylaminosäureamide. Es sollten verschiedene EDGs und EWGs in die Molekülteile A und B eingeführt werden. Im Molekülteil C sollten verschiedene Aminosäuren getestet werden. Zudem sollten im Molekülteil A verschiedene aromatische Ringe untersucht und das Verbindungselement X variiert werden. Zudem sollte der Abstand des Molekülteil B zu dem Carbonsäureamid-Stickstoff modifiziert werden.

3.9.2 Synthese der *N*-Acylaminosäureamide

Die Darstellung der *N*-Acylaminosäureamide erfolgte in einer dreistufigen Synthese mit verschiedenen D- und L-Aminosäuren (Schema 16). Der erste Schritt war eine Kupplungsreaktion der Boc-geschützten Aminosäure (**171**) mit primären Aryl(alkyl)aminen (**172**) mithilfe von HATU und DIPEA. Im zweiten Schritt wurde die Boc-Schutzgruppe durch 4 M HCl in Dioxan abgespalten. Beim dritten Schritt handelte es sich ebenfalls um eine Kupplungsreaktion der erhaltenen Carbonsäureamide (**174**) mit Carbonsäuren (**175**) mithilfe von EDC · HCl, HOBT und Triethylamin. Bei einigen Phenyllessigsäure-Derivaten wurde hier statt der Phenyllessigsäure das entsprechende Carbonsäurechlorid (**176**) zur Synthese verwendet, sodass in diesem Fall eine nucleophile Substitution mit Triethylamin als Base durchgeführt wurde.



Schema 16: Synthese der *N*-Acylaminosäureamide: 1. HATU-Kupplung, 2. Boc-Abspaltung, 3. a) Kupplungsreaktion mit EDC·HCl, HOBT, Et₃N, DCM, 24 h, 0 °C → RT. b) Nucleophile Substitution mit Et₃N, DCM, 24 h, 0 °C → RT.

Modifikation des Molekülteil A

In dieser Serie wurde Phenylglycin-*N*-phenylamid als die die Taschen B und C adressierende Struktur beibehalten. Zur Adressierung der Tasche A wurden verschiedene ein- und zwei-kernige Aromaten entweder direkt amidisch mit der α -Aminogruppe des Phenylglycinamids verknüpft oder es wurden ein- bis drei-atomige Verbindungselemente zwischen Aryl- und Carbonylgruppe eingeführt. Die Zielverbindungen mit ihren Ausbeuten sind in Abbildung 53 zusammengefasst.

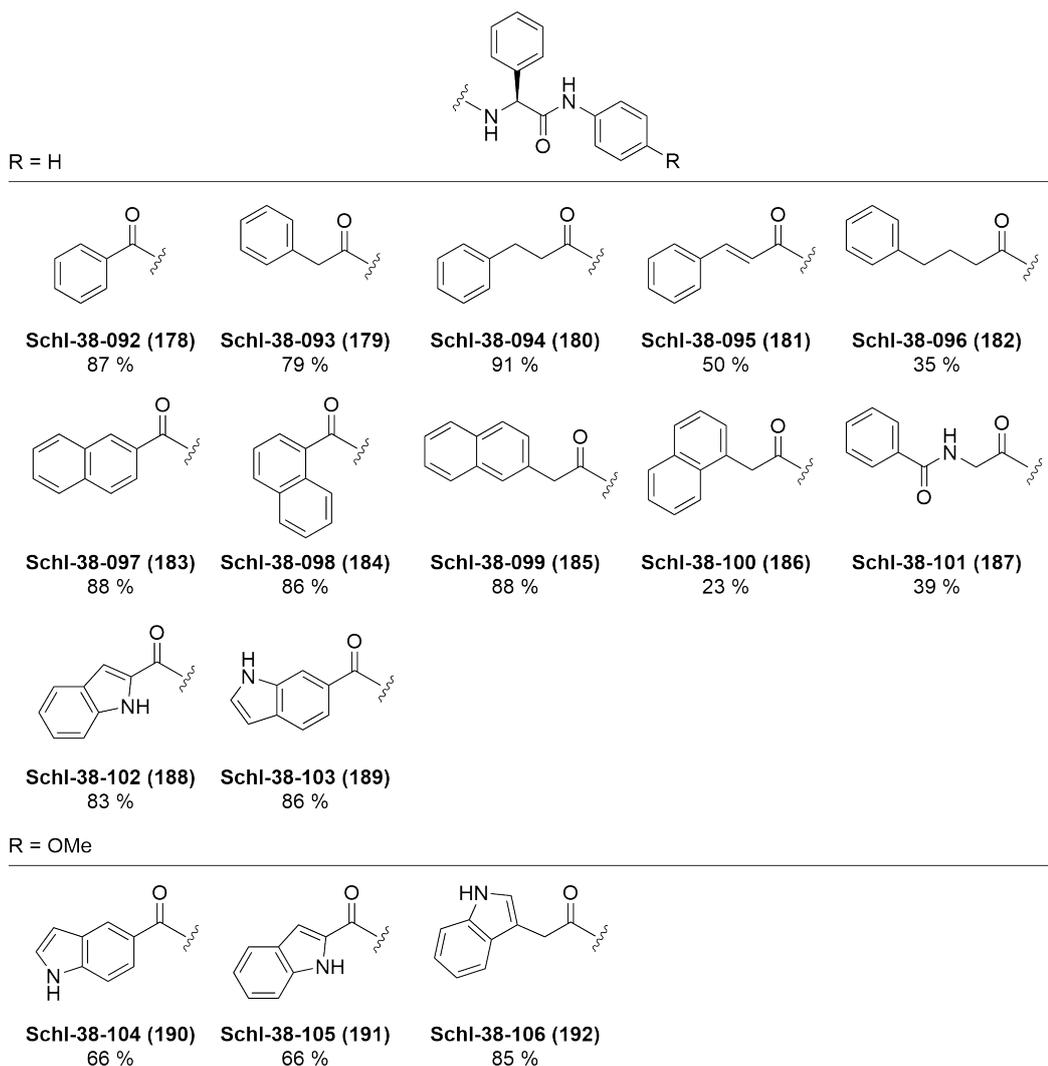


Abbildung 53: Dargestellte *N*-Acylaminosäureamide mit Modifikationen des Molekülteil A und ihre Ausbeuten.

Die ersten beiden Stufen zur Synthese des Phenylglycinanilids (kurz: *H*-L-Phg-A; H $\hat{=}$ freie α -Aminogruppe, Phg $\hat{=}$ Phenylglycin, A $\hat{=}$ amidisch verknüpfter Anilin-Rest) verliefen sehr gut und analog zu der in Schema 16 (S.89) gezeigten Route mit Ausbeuten von 97 % und 87 %. Die Kupplung mit EDC/HOBt im ersten Schritt wurde parallel zur Kupplung mit HATU getestet und ergab eine Ausbeute von nur 58 %, was in Anbetracht der benötigten großen Mengen die praktische Nutzbarkeit einschränkte, weswegen diese Methode nicht weiter verfolgt wurde. Dagegen war die Synthese des Edukts im großen Maßstab (ca. 5 g) mit der HATU-Kupplung ohne Probleme möglich. Bei der dritten Stufe handelte es sich ebenfalls um

eine Kupplungsreaktion, die zum großen Teil mit HATU, DIPEA in DMF und teilweise mit EDC/HOBt, Triethylamin in DCM (**Schl-38-096**, **Schl-38-101** und alle Indol-Derivate) durchgeführt wurde. Nur Verbindung **Schl-38-093** wurde mittels einer nucleophilen Substitution aus dem Säurechlorid gewonnen. Als Reaktionsbedingungen wurden Triethylamin als Base in DCM verwendet. Die Reaktionen zur Darstellung aller Zielverbindungen verlief reibungslos und ohne Probleme bei der Reinigung mit guten Ausbeuten für die Mehrheit der Substanzen und niedrigen bis moderaten Ausbeuten für vier Derivate.

Die biologische Testung der Verbindungen erfolgte mittels eines DLA bei einer Konzentration von 1 μM bzw. 10 μM , bei der die zu analysierende Verbindung nicht zytotoxisch wirkte. Die Ergebnisse für die Modifikation des Molekülteil A sind in Abbildung 54 zusammengefasst.

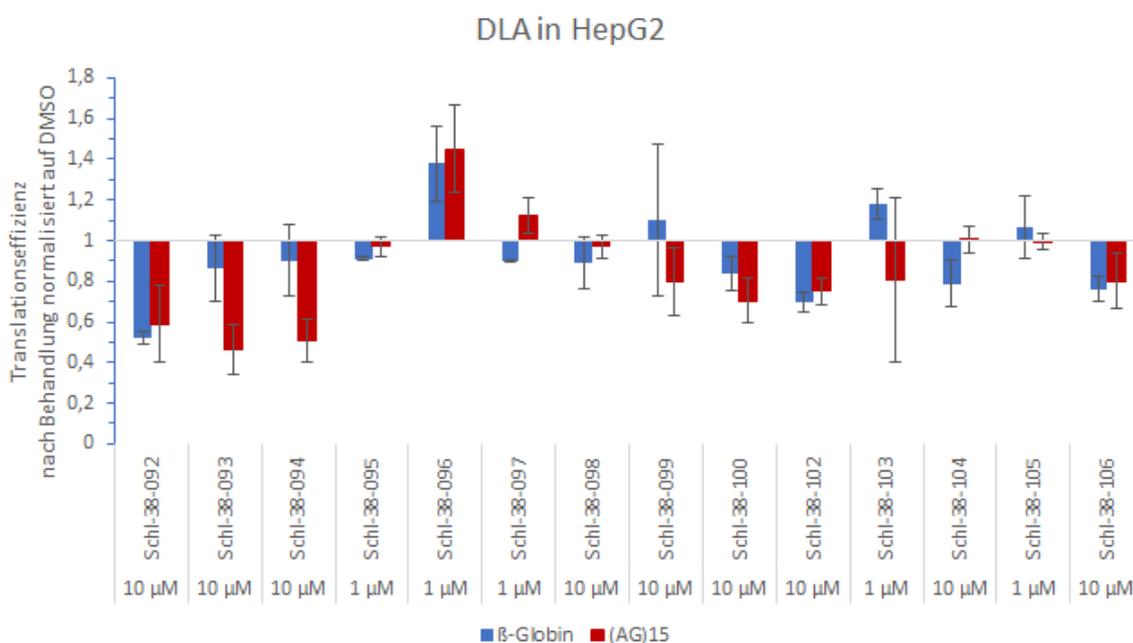


Abbildung 54: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist Derivate mit Modifikationen des Molekülteil A zusammengefasst.

Anhand der dargestellten Ergebnisse kristallisieren sich deutlich zwei Verbindungen heraus, die einen starken signifikanten und spezifischen inhibitorischen Effekt auf die Translation ausüben. Dabei handelt es sich um das Phenylessigsäure- und Phenylpropionsäure-Derivat (**Schl-**

38-093 und **Schl-38-094**), die die Translation von (AG)₁₅ bei einer Konzentration von 10 μ M um 54 % und 49 % reduzieren. Mit dem Benzoyl-Derivat **Schl-38-092** konnte nur ein unspezifischer Effekt erreicht werden. Das Zimtsäure-Derivat (**Schl-38-095**) wies eine geringe Löslichkeit in den biologischen Assays auf und zeigte bei einer Konzentration von 1 μ M keinen Effekt auf die Translation. Bei dem Phenylbutanoyl-Derivat **Schl-38-096** ergab sich ein gegenteiliger Effekt und es kam zu einer Hochregulation der beiden Parameter. Alle anderen Strukturen führten zu keinem spezifischen inhibitorischen Effekt. **Schl-38-101**, bei dem ein Benzoylrest über ein Glycin mit dem Phenylglycinamid-Baustein verknüpft ist, wurde aufgrund seiner fehlenden Zytotoxizität nicht im DLA gemessen. Aus diesen Ergebnissen konnte die Phenylessig- und Phenylpropionsäure mit einer Alkylkette von n=1,2 als optimale Grundstruktur zur weiteren Entwicklung identifiziert werden. Die Kettenlänge von n=2 findet sich auch im Falle der rigideren Zimtsäure, sodass in weiteren Modifikationen die Löslichkeit dieses Derivats verbessert werden sollte.

Die Indol-Derivate wurden zunächst nur in einem *Thermal-Shift-Assay* (TSA) in einem großen Screening zusammen mit anderen Verbindungen biologisch untersucht. Das Potential der Indol-Derivate zeigte sich durch eine signifikante Temperaturverschiebung von 1.34 °C für **Schl-38-102** und 1.12 °C für **Schl-38-103**, was auf eine Stabilisierung des Helikase-Komplexes durch die Bindung des Inhibitors hindeutete. Eine Hemmung der Translationseffizienz konnte jedoch im anschließend durchgeführten DLA nicht bestätigt werden. Sämtliche Indol-Derivate (**Schl-38-102** bis **Schl-38-106**) zeigten entweder keinen oder einen nicht signifikanten schwachen unspezifischen Effekt im DLA. So konnte keine Korrelation des Ergebnisses des TSA mit einer Hemmung der Translation nachgewiesen werden.

Substitutionen am Phenylrest der Phenylessigsäure-, Phenylpropionsäure- und Zimtsäure-Grundstrukturen

Aus den biologischen Testungen ergaben sich nach der in Kapitel 3.9.2 (S.89) beschriebenen Modifikation drei Grundstrukturen, die vielversprechend waren und weiterer Optimierungen bedurften. Diese waren zum einen das Phenylessig- und das Phenylpropionsäure-Derivat, die

im DLA einen inhibitorischen Effekt von bis zu 50 % auf die Translation bei einer Konzentration von 10 μM gezeigt hatten. Zum anderen war es das Zimtsäure-Derivat, das zwar im Assay nicht gut löslich war, sich jedoch im Docking sehr gut in die Bindetasche des eIF4A-RNA-Komplexes einfügte. Durch die Einführung verschiedener EDGs und EWGs in den Phenylrest sollte das Strukturelement A variiert werden. Bei den Phenyllessigsäure-Derivaten wurden vorwiegend Methoxygruppen zur Erhöhung der Elektronendichte im Molekülteil A genutzt. Dies sollte zu einer Verbesserung der Hemmwirkung führen, da die Subtasche A durch die Base A7 relativ elektronenarm ist und eine komplementäre elektronische Eigenschaft im Molekülteil A zu einer verstärkten π - π -Wechselwirkung führen sollte. Hierbei wurden auch zwei- und dreifache Substitutionen in unterschiedlichen Positionen des Rings vorgenommen. Als Negativkontrolle wurden auch EWGs eingeführt. Abbildung 55 zeigt alle zwölf Phenyllessigsäure-Derivate mit ihren Ausbeuten.

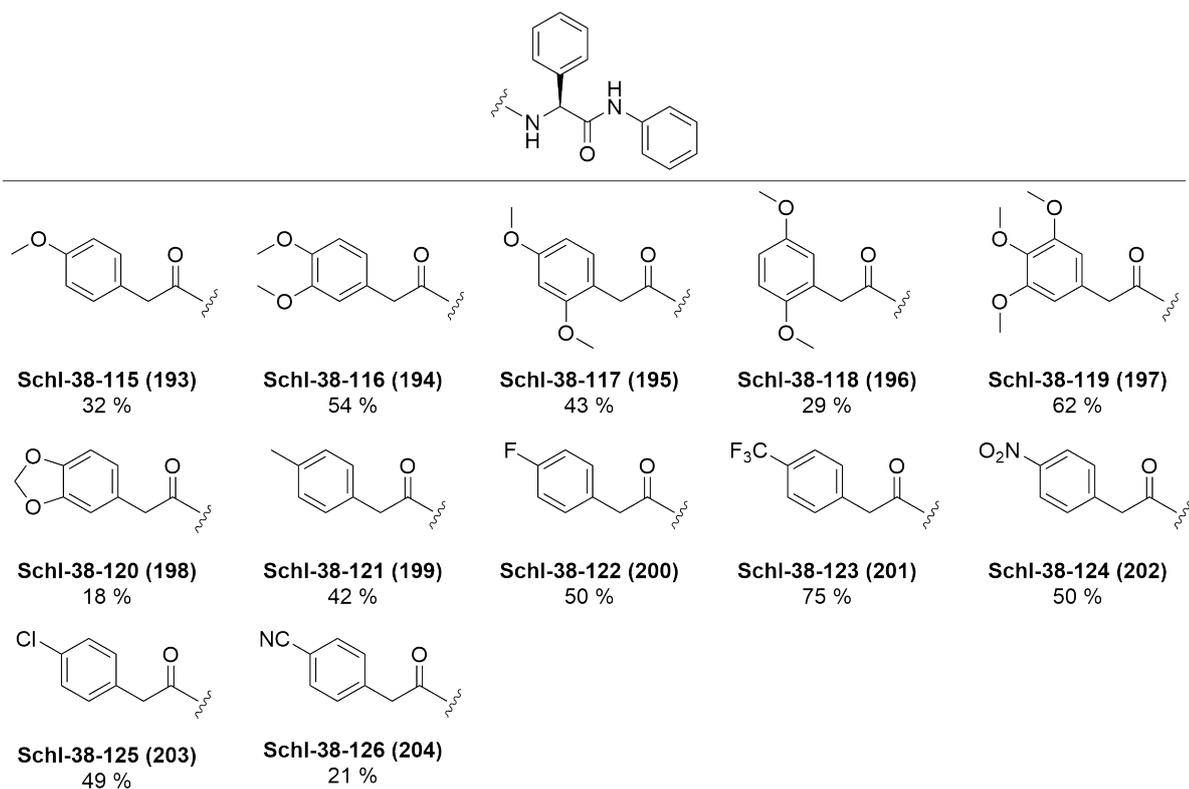


Abbildung 55: Dargestellte Phenyllessigsäure-Derivate mit verschiedenen Substituenten am Phenylrest des Molekülteil A und ihre Ausbeuten.

Die Darstellung der Verbindungen **Schl-38-115** bis **Schl-38-126** erfolgte nach dem Schema 16 (S.89). Die ersten beiden Schritte bestanden in der Synthese des bereits oben genannten Edukts *H-L-Phg-A*. In der dritten Stufe wurde eine Kupplungsreaktion mit EDC/HOBt durchgeführt und lieferte die Zielverbindungen mit niedrigen bis guten Ausbeuten. Grund für die niedrigen Ausbeuten war, dass der Großteil der Verbindungen mehrfach säulenchromatographisch gereinigt werden musste. Die Synthese der entsprechenden Phenylpropion- und Zimtsäure-Derivate verlief analog. Die Ausbeuten der Kupplungsreaktion sind in Abbildung 56 und 57 dargestellt. Hier wurde nur eine geringe Anzahl an EDGs und EWGs sowie Substitutionsmustern realisiert, da erst die biologischen Testergebnisse der Phenyllessigsäure-Derivate abgewartet werden sollten. Auch hier lief die Synthese problemlos; lediglich im Falle einzelner Verbindungen war eine mehrfache Reinigung erforderlich.

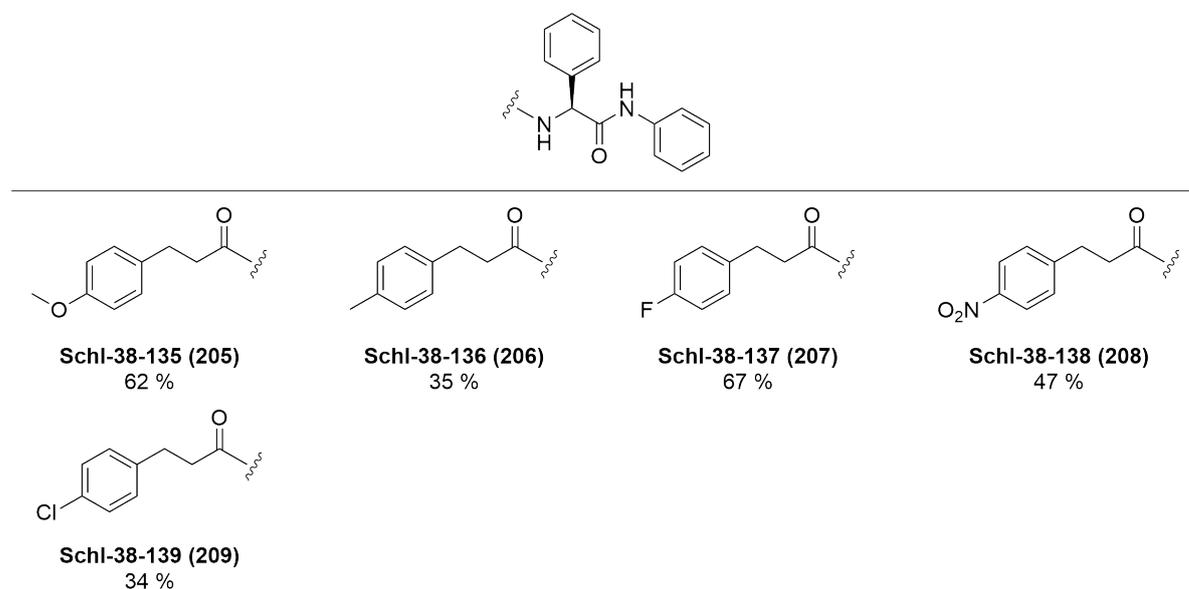


Abbildung 56: Dargestellte Phenylpropionsäure-Derivate mit verschiedenen Substituenten am Phenylrest des Molekülteil A und ihre Ausbeuten.

Bei den Zimtsäure-Derivaten wurde in einer zweiten Serie zusätzlich auch die Auswirkungen von Veränderungen im Molekülteil B getestet. Die Synthese verlief nach der Standard-Vorschrift und lieferte vier Verbindungen mit geringen Ausbeuten von 13-22 % (Abbildung 57), was sich durch Schwierigkeiten in der Reinigung erklären lässt. So war in **Schl-38-163** und **Schl-38-164** nach der Kupplung mithilfe von HATU noch Tetramethylharnstoff im Produkt

enthalten, das durch mehrfaches Waschen mit Wasser entfernt werden musste. Bei den anderen beiden Verbindungen, die durch eine EDC/HOBt-Kupplung synthetisiert wurden, gestaltete sich die Auftrennung in der Säulenchromatographie problematisch, sodass nur ein Bruchteil des Produkts in wenigen Fraktionen rein erhalten werden konnte.

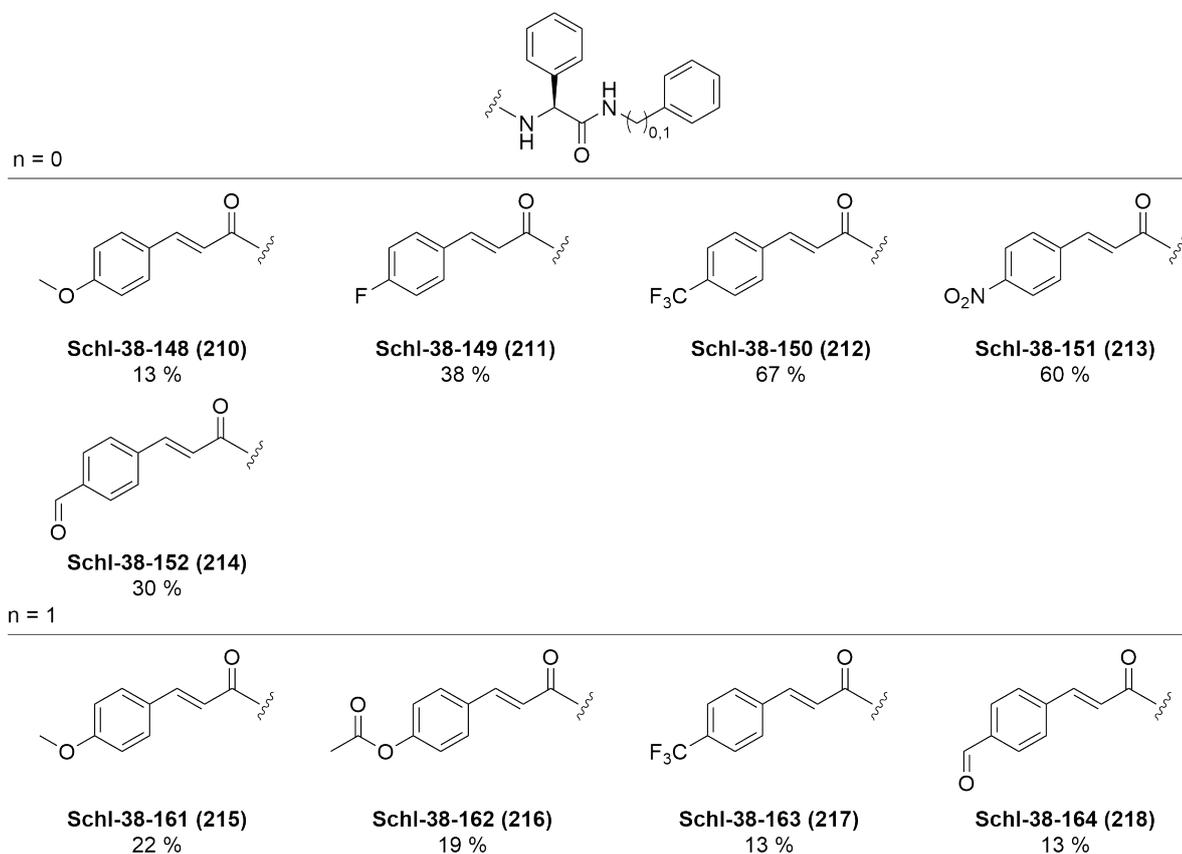


Abbildung 57: Dargestellte Zimtsäure-Derivate mit verschiedenen Substituenten am Phenylrest des Molekülteil A und ihre Ausbeuten.

Die Ergebnisse der biologischen Testung sind im Folgenden zusammengefasst. Der DLA wurde für alle Phenyllessigsäure-Derivate mit Modifikationen im Molekülteil A bei unterschiedlichen Konzentrationen (10 μ M bzw. 100 μ M) gemessen, bei denen die Verbindungen nicht zytotoxisch wirkten (Abbildung 58). Aus der Abbildung geht klar hervor, dass jeder verwendete Substituent zu einem kompletten Wirkungsverlust führt. Es lässt sich vielmehr feststellen, dass der spezifische inhibitorische Effekt von 54 % der Phenyllessigsäure-Grundstruktur hierdurch komplett verloren geht.

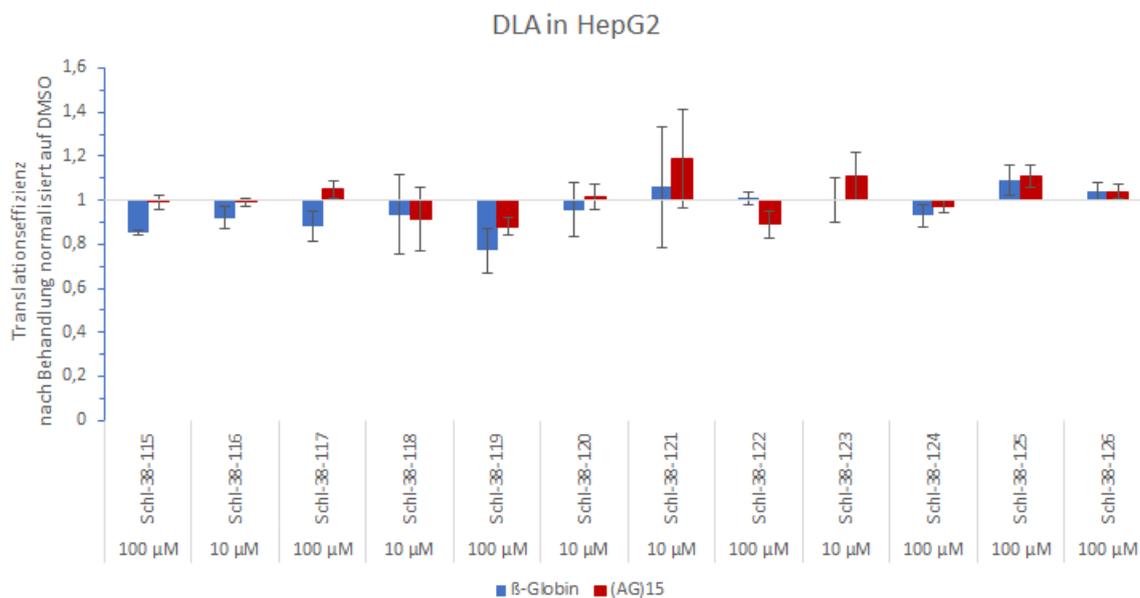


Abbildung 58: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für die Phenyllessigsäure-Derivate mit verschiedenen Substituenten am Phenylrest des Molekülteil A zusammengefasst.

Die Testung der Phenylpropionsäure-Derivate auf einen inhibitorischen Effekt ist in Abbildung 59 gezeigt. Der DLA wurde bei Konzentrationen von 10 μM bzw. 100 μM durchgeführt. Auch hier konnte kein Effekt auf die Translation beobachtet werden. Auffällig war in dieser Serie lediglich die Hochregulierung der Translation von (AG)₁₅ durch das Methyl- (**Schl-38-136**) und das Fluor-Derivat (**Schl-38-137**) der Phenylpropionsäure-Grundstruktur. Die anderen Derivate wiesen denselben Effekt auf, der auch bei der Phenyllessigsäure-Serie beobachtet werden konnte, und zeigten keine Hemmwirkung.

Die Einführung von Substituenten im Molekülteil A sollte im Idealfall eine Verbesserung der Löslichkeit der Grundstruktur bewirken. So konnten die Verbindungen im DLA bei einer Konzentration von 1 μM bzw. 10 μM getestet werden. In Abbildung 60 sind die Ergebnisse für die Zimtsäure-Derivate der *N*-Phenylphenylglycinamide und in Abbildung 61 der *N*-Benzylphenylglycinamide zu sehen. Aus den in Abbildung 60 dargestellten Ergebnissen konnte keine spezifische Hemmwirkung für die Zimtsäure-Serie mit verschiedenen Substituenten im Molekülteil A abgelesen werden. Auffällig war die sehr starke Hochregulation

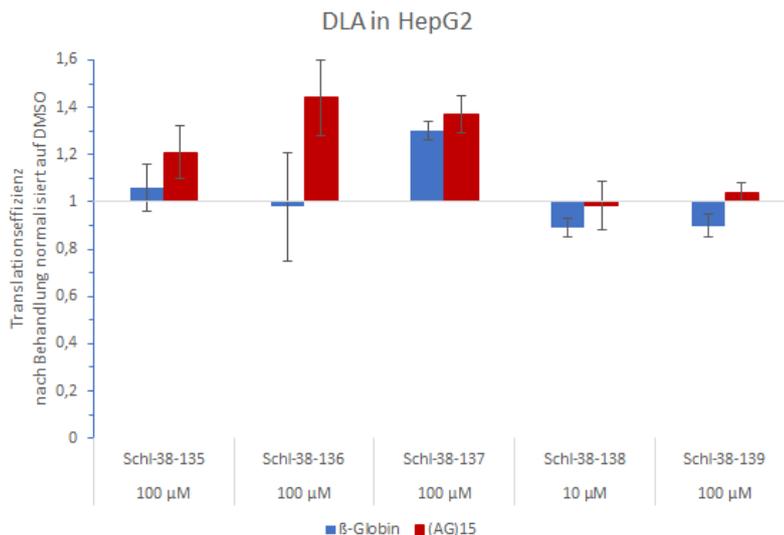


Abbildung 59: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für die Phenylpropionsäure-Derivate mit verschiedenen Substituenten am Phenylrest des Molekülteil A zusammengefasst.

der Translationseffizienz von β -Globin und (AG)₁₅ durch das Methoxy- (**Schl-38-148**) und Trifluormethyl-Derivat (**Schl-38-150**). Zwei Verbindungen bewirkten einen unspezifischen Effekt auf die Translation von 43 % durch das Nitro-Derivat (**Schl-38-151**) und 29 % durch das Carbonyl-Derivat (**Schl-38-152**). Bei der Zimtsäure-Serie mit einem *N*-Benzylphenylglycinamid wurde das Carbonyl-Derivat (**Schl-38-164**) aufgrund der geringen Zytotoxizität nicht im DLA gemessen. Die Einführung einer Methoxygruppe (**Schl-38-161**) sowie einer Trifluormethylgruppe (**Schl-38-163**) in die Zimtsäure ergab keinen Effekt auf die Translation. Die Einführung eines Methylesters in die Zimtsäure (**Schl-38-162**) führte hingegen zu einem starken unspezifischen Effekt von 69 %. Abschließend ist festzuhalten, dass auch in dieser Serie durch Substitutionen des Phenylrests im Molekülteil A keine Verbesserung der Hemmwirkung erzielt werden konnte.

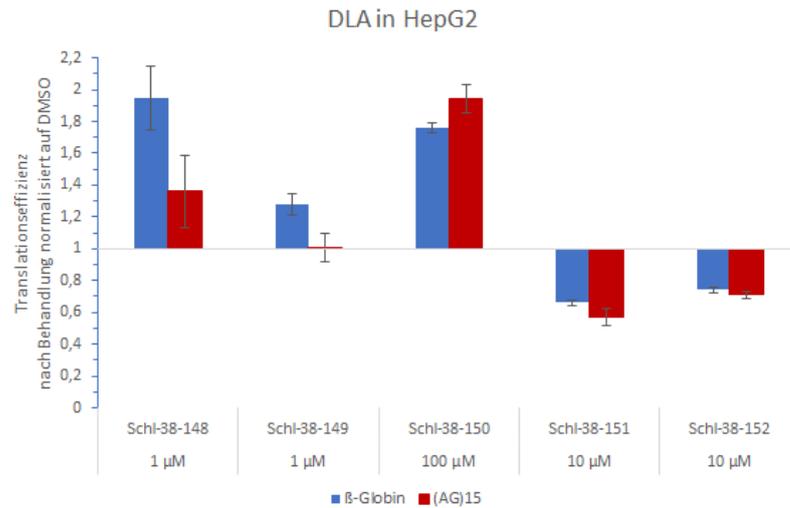


Abbildung 60: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für die Zimtsäure-Derivate mit verschiedenen Substituenten am Phenylrest des Molekülteil A und einem Phenylrest im Molekülteil B zusammengefasst.

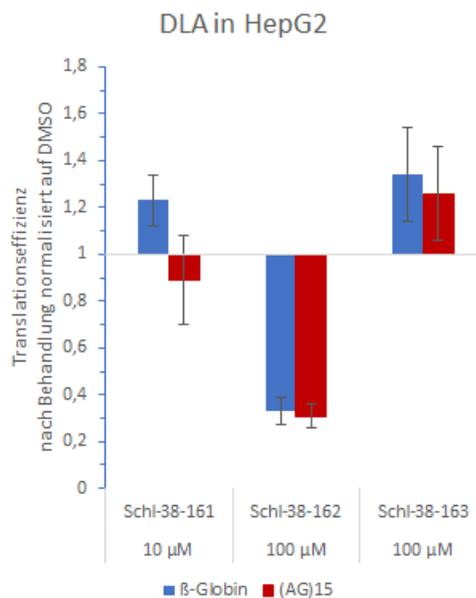
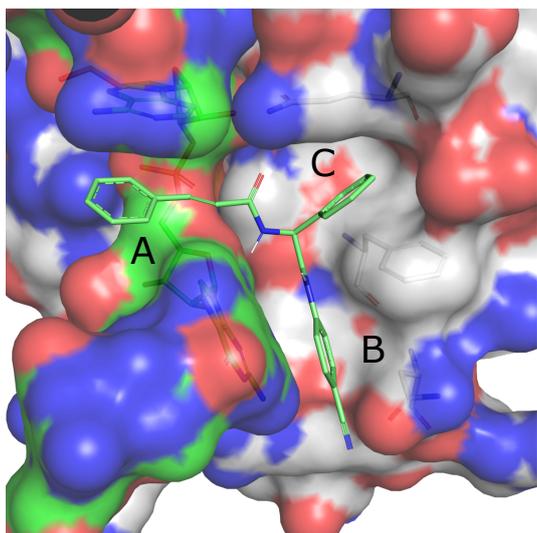


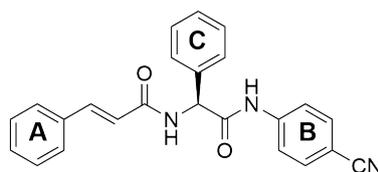
Abbildung 61: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für die Zimtsäure-Derivate mit verschiedenen Substituenten am Phenylrest des Molekülteil A und einem Benzylrest im Molekülteil B zusammengefasst.

Modifikation des Molekülteil B der Phenyllessigsäure-, Phenylpropionsäure- und Zimtsäure-Grundstrukturen

Das Strukturmotiv B aller drei Grundstrukturen (Phenyllessigsäure, Phenylpropionsäure und Zimtsäure) wurde in seinen elektronischen Eigenschaften modifiziert. Dies gelang durch die Einführung verschiedener EDGs oder EWGs. Obwohl die Bindetasche durch die darin liegende Purinbase elektronenarm ist und nur elektronenreiche Strukturelemente optimal sein sollten, sollten als Negativbeispiel auch EWGs in das Strukturmotiv B eingeführt werden. Hier wurde insbesondere der Cyano-Substituent als potentiell erfolgversprechend ausgemacht, da zu diesem Zeitpunkt eFT226 (Zotatifin) als erster eIF4A-Inhibitor mit guten physikochemischen Eigenschaften in die klinischen Studien ging.^[86] Ein zweiter wichtiger Punkt war der Versuch mithilfe der Carbonsäureamid- und Sulfonamid-Strukturen in der *para*-Position des Rings eine weitere Wasserstoffbrücke mit Asn167 zu adressieren.



(a) **Schl-38-157** (Cyano-Substituent).



Schl-38-157

Abbildung 62: Exemplarische Dockingpose des Cyano-Derivats **Schl-38-157** in der Kristallstruktur des Helikase-Komplexes (PDB:5ZC9)^[66]: (a) Zimtsäure-Derivat mit Cyano-Substituent am Phenylrest im Molekülteil B (**Schl-38-157** in grün). Es ist eine gute Ausfüllung der Bindetasche sowie Adressierung der π - π -Wechselwirkungen zu den zwei Basen der RNA und Phe163 zu sehen.

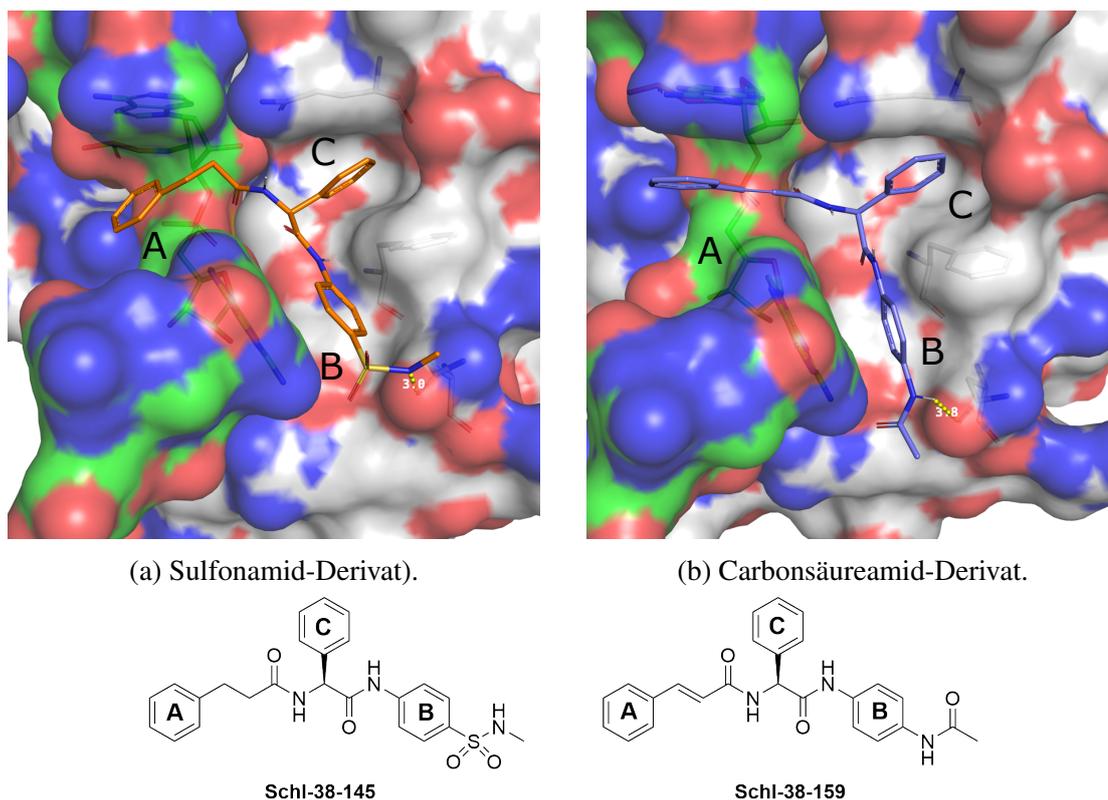
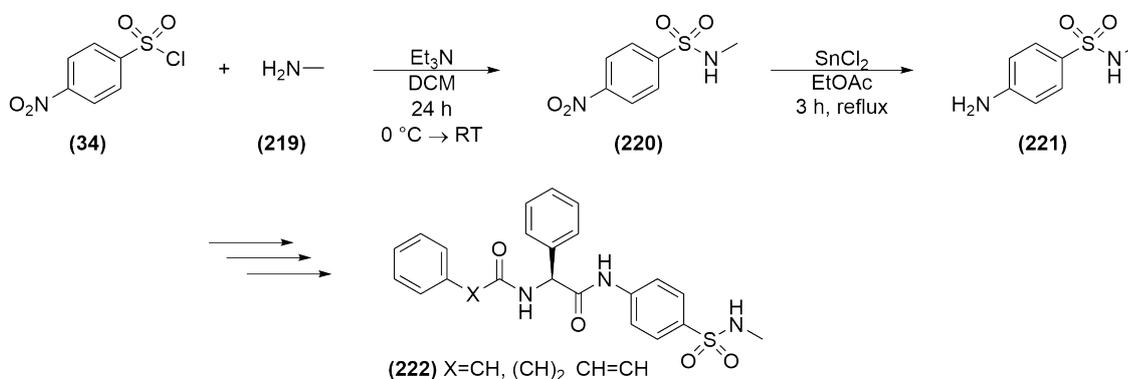


Abbildung 63: Exemplarische Dockingposen von zwei Derivaten mit Modifikationen im Molekülteil B in der Kristallstruktur des Helikase-Komplexes (PDB:5ZC9)^[66]: (a) Phenylpropionsäure-Derivat mit Sulfonamid-Substituent am Phenylrest im Molekülteil B (**Schl-38-145** in orange) (b) Zimtsäure-Derivat mit Carbonsäureamid-Substituent am Phenylrest im Molekülteil B (**Schl-38-159** in blau). Beide Derivate zeigen eine gute Ausfüllung der Bindetasche und adressieren die π - π -Wechselwirkungen zu den zwei Basen der RNA und Phe163. Darüber hinaus nehmen die Carbonsäureamid- und Sulfonamid-Substituenten einen Abstand zu Asn167 ein, der die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke ermöglichen könnte.

Die Edukte zur Darstellung der Zielverbindungen wurden einzeln nach der in Schema 16 (S.89) gezeigten Syntheseroute in einem größeren Maßstab (2.5 g) hergestellt. Die Synthese verlief problemlos und lieferte für die Bildung des Amids Ausbeuten von 21-93 % und für die Boc-Abspaltung Ausbeuten von 38-100 %. Bei der Synthese des entsprechenden Amins zur Darstellung von **Schl-38-132** gingen zwei Stufen dem oben genannten Syntheschema voraus. Zunächst erfolgte eine nucleophile Substitution ausgehend von Methylamin (**219**) und 4-Nitrobenzonsulfonylchlorid (**34**) und dann eine Reduktion mit Zinn(II)-chlorid, um das 4-

Amino-*N*-methylbenzonsulfonamid (**221**) für die anschließende Kupplung mit dem Boc-geschützten Phenylglycin zu erhalten. Die beiden Reaktionsschritte verliefen problemlos und mit guten Ausbeuten von 71 % und 65 %.



Schema 17: Synthese von 4-Amino-*N*-methylbenzonsulfonamid als Edukt für die Darstellung der im Molekülteil B substituierten Derivate.

Im Folgenden sind die Ausbeuten der Zielverbindungen mit den Modifikationen in des Molekülteil B für die Phenyllessig- (Abbildung 64), Phenylpropion- (Abbildung 65) und Zimtsäure-Derivate (Abbildung 66) zusammengefasst.

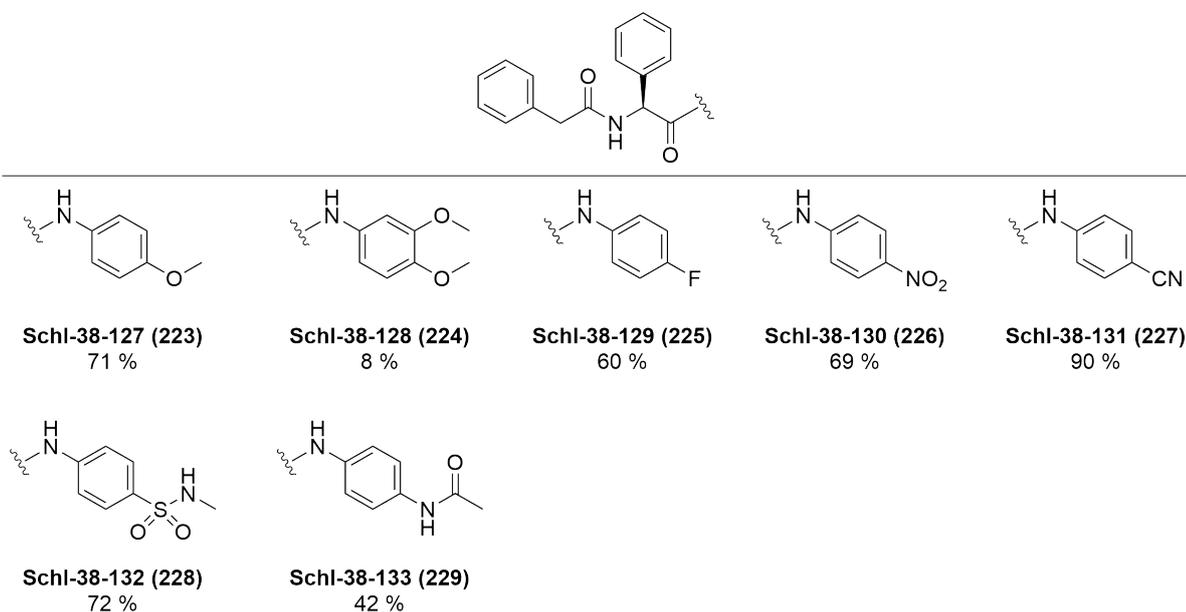


Abbildung 64: Dargestellte Phenyllessigsäure-Derivate mit Modifikationen des Molekülteil B und ihre Ausbeuten.

Die Synthese der Phenyllessigsäure-Derivate erfolgte durch Umsetzung der entsprechenden Amine mit Phenylacetylchlorid in einer nucleophilen Substitution. Eine Ausnahme bildete **Schl-38-133**. Dieses wurde wie alle Phenylpropion- und Zimtsäure-Derivate mithilfe einer Kupplungsreaktion mit EDC/HOBt dargestellt. Die Zielverbindungen konnten ohne Probleme gewonnen werden. Bei den Verbindungen mit der 3,4-Dimethoxy-Substitution waren lediglich zwei säulenchromatographische Reinigungen und bei denen mit dem Acetamido-Motiv eine Umkristallisation zum Erhalt des reinen Produkts notwendig.

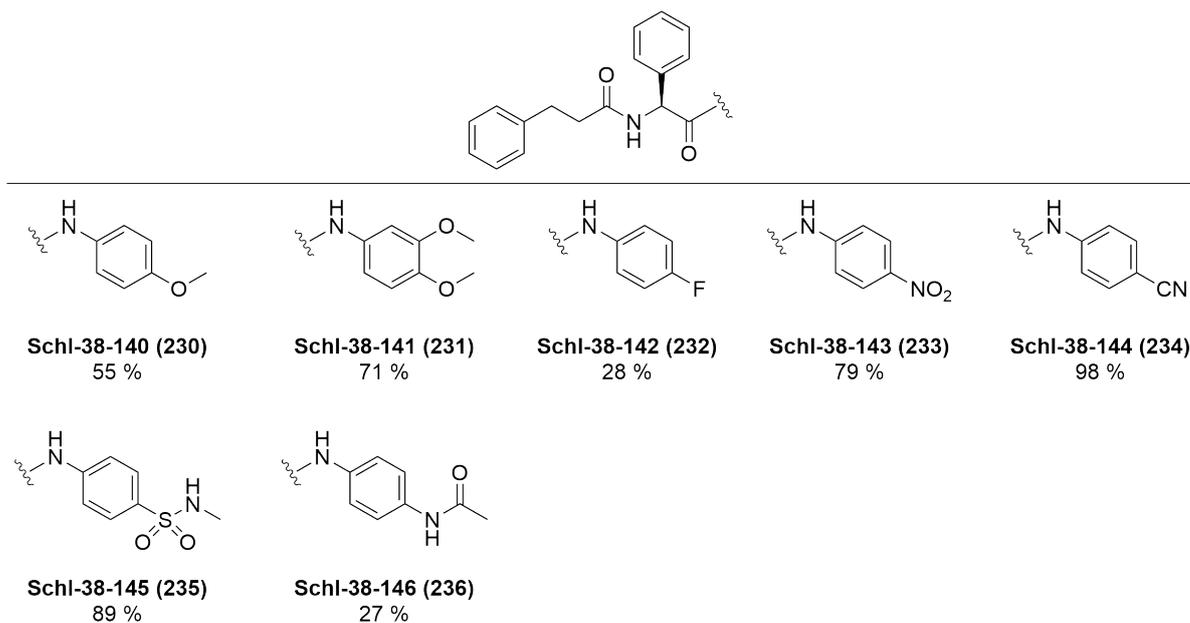


Abbildung 65: Dargestellte Phenylpropionsäure-Derivate mit Modifikationen des Molekülteil B und ihre Ausbeuten.

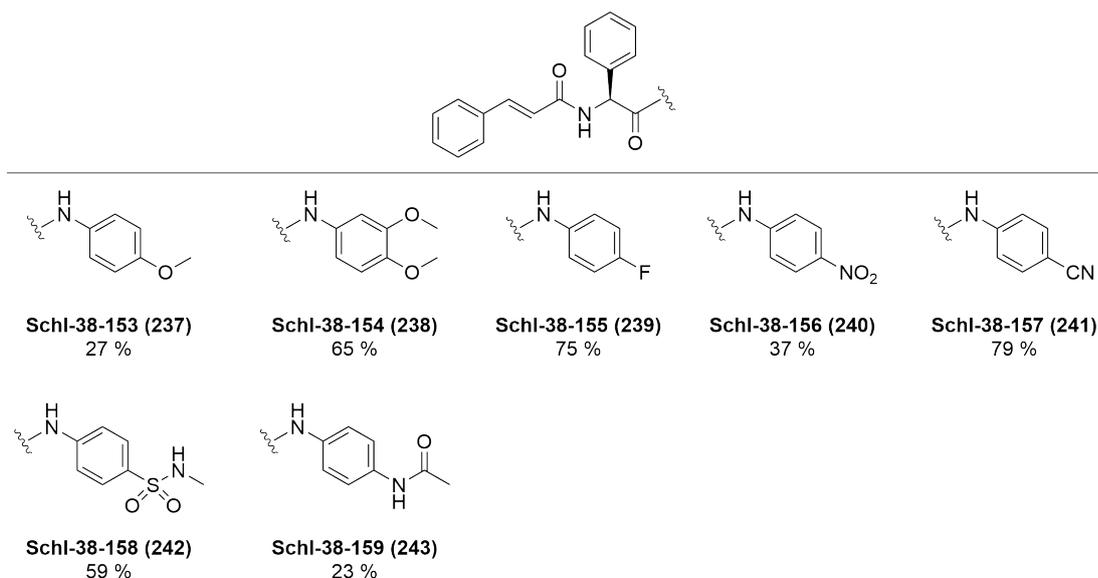


Abbildung 66: Dargestellte Zimtsäure-Derivate mit Modifikationen des Molekülteil B und ihre Ausbeuten.

Die biologische Testung erfolgte mittels eines DLA bei einer nicht zytotoxischen Konzentration, die über einen WST-1-Assay bestimmt wurde. So waren die Konzentrationen für die jeweilige Verbindung unterschiedlich und lagen entweder bei 1 μM , 10 μM oder 100 μM . Die Ergebnisse der Phenyllessigsäure-Serie mit Modifikationen des Molekülteil B sind in Abbildung 67 gezeigt. Aus der Phenyllessigsäure-Serie wurden das Fluor- (**Schl-38-129**), das Nitro- (**Schl-38-130**) und das Acetamido-Derivat (**Schl-38-133**) aufgrund ihrer geringen Zytotoxizität nicht getestet. Die anderen eingeführten Substituenten bewirkten keine signifikante Reduktion der Translationseffizienz.

Aus der Phenylpropionsäure-Serie wurden ebenfalls zwei Verbindungen wegen ihrer geringen Zytotoxizität nicht im DLA getestet, nämlich das 3,4-Dimethoxy-Derivat (**Schl-38-141**) und das Methylcarbonsäureamid-Derivat (**Schl-38-146**). Die anderen Verbindungen dieser Serie wiesen keinen inhibitorischen Effekt auf. Nur das Cyano-Derivat (**Schl-38-144**) stach wegen der starken Hochregulation der Translationseffizienz von (AG)₁₅ hervor.

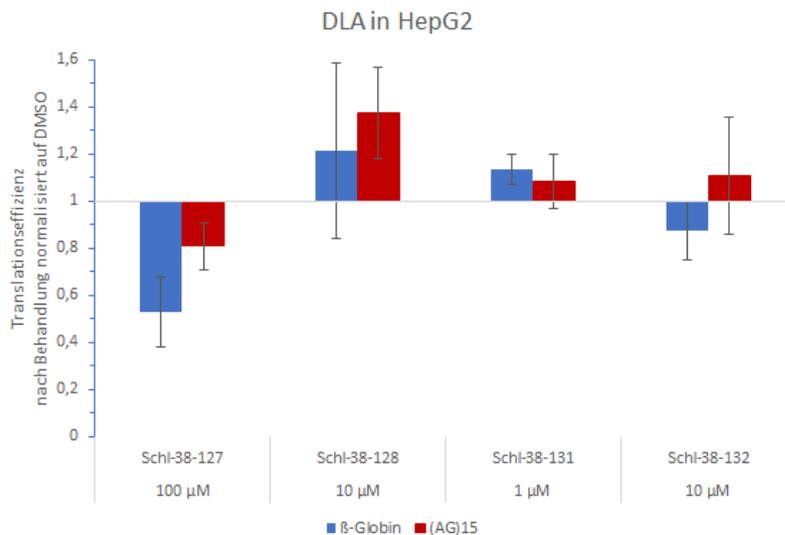


Abbildung 67: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für die Phenyllessigsäure-Derivate mit Modifikationen des Molekülteil B zusammengefasst.

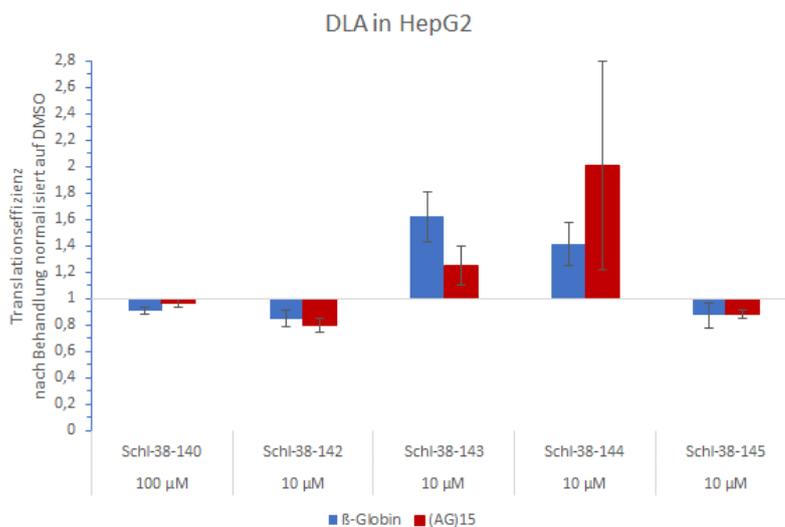


Abbildung 68: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für die Phenylpropionsäure-Derivate mit Modifikationen des Molekülteil B zusammengefasst.

Die Hochregulation der Translationseffizienz von (AG)₁₅ und β-Globin konnte auch in der Zimtsäure-Serie bei **Schl-38-154** (3,4-Dimethoxy-Rest), **Schl-38-156** (Nitro-Rest), **Schl-38-157** (Cyano-Rest) und **Schl-38-158** (N-Methylsulfamoyl-Rest) beobachtet werden, wobei hier

auch β -Globin betroffen war. Bei den anderen Verbindungen dieser Serie, mit Ausnahme von **Schl-38-155** (Fluor-Rest), konnte keine Hemmwirkung beobachtet werden. Das Fluor-Derivat (**Schl-38-155**) hatte keinen Effekt auf das β -Globin und reduzierte die Translation von (AG)₁₅ um 26 % bei einer Konzentration von 10 μ M.

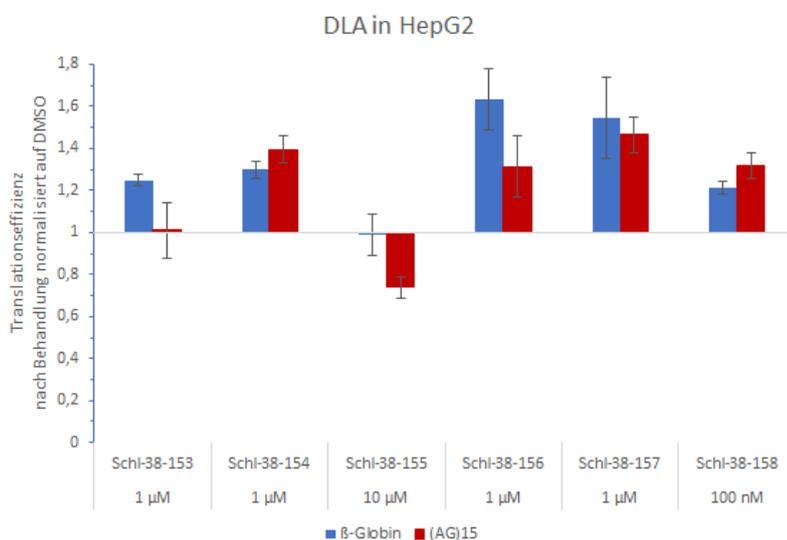


Abbildung 69: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für die Zimtsäure-Derivate mit Modifikationen des Molekülteil B zusammengefasst.

Abschließend konnte wie schon bei der Modifikation des Molekülteil A auch hier keine Verbesserung des inhibitorischen Effekts auf die Translation erzielt werden. Der Versuch der Optimierung der elektronischen Eigenschaften des Phenylrests im Molekülteil B führte ebenso zu keiner spezifischen Hemmung bzw. bei einigen Verbindungen teilweise zu einer starken Hochregulation des Translationseffizienz von β -Globin und (AG)₁₅. Folglich kann geschlussfolgert werden, dass die beiden Phenylreste in den Molekülteilen A und B unsubstituiert bleiben sollten. Die einzige Ausnahme stellt das Fluorphenyl-Derivat aus der Zimtsäure-Serie (**Schl-38-155**) dar, welches einen signifikanten spezifischen inhibitorischen Effekt von 26 % zeigte. Die Hemmwirkung durch die Einführung eines elektronenziehenden Substituenten überrascht, da die Tasche B idealerweise mit einer elektronenreichen Struktur adressiert werden sollte. Der Cyano-Substituent führte bei allen drei Serien zu keiner Verbesserung und so konnte die gute Hemmwirkung von eFT226 nicht nachgeahmt werden.

Modifikation der Molekülteile A und B

In Anschluss an die Modifikationen der einzelnen Molekülteile wurden die Verbindungen **Schl-38-134**, **Schl-38-147** und **Schl-38-160** synthetisiert, um die Auswirkungen zweier kombinierter Variationen der Molekülteile A und B auf die Hemmwirkung zu untersuchen. Die drei Grundstrukturen mit je einem *para*-Methoxy substituierten Phenylrest der Molekülteile A und B sind mit ihren Ausbeuten in Abbildung 70 dargestellt.

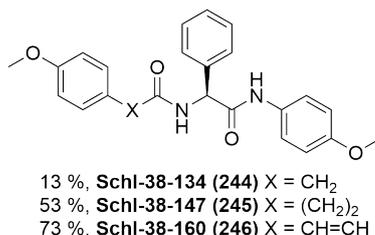


Abbildung 70: Dargestellte *N*-Acylaminosäureamide mit Modifikationen der Molekülteile A und B.

Die Einführung der zwei Methoxygruppen entspricht dem rationalen Design, da beide in den Subtaschen A und B zu adressierende Aromaten elektronenarm sind und folglich die Phenylreste des potentiellen Inhibitors die gegensätzlichen elektronischen Eigenschaften besitzen sollten. In den biologischen Testungen zeigten jedoch alle drei Verbindungen bei Konzentrationen von 10 μ M und 100 μ M keine Zytotoxizität, sodass sie aus dem DLA zur Bestimmung des inhibitorischen Effekts ausgeschlossen wurden. Hintergrund dieser Entscheidung waren die bisherigen Erfahrungen und Erkenntnisse aus dem DLA, nach denen Inhibitoren eine gewisse Toxizität gegenüber den Zellen aufweisen sollten.

Modifikation des Molekülteil C

Die Variation des die Tasche C adressierenden Liganden bestand im Austausch des Phenylrests der Phenylglycin-Basisstruktur durch einen anderen hydrophoben Rest, etwa durch die Verwendung der Aminosäure Leucin, Isoleucin oder Valin. Wiederum wurden Phenylessig-, Phenylpropion- und Zimtsäure-Derivate synthetisiert. Darüber hinaus sollten wieder der Phenyl- und der Benzylrest zur Adressierung der Subtasche B verwendet werden. Insgesamt konnten 21 Verbindungen dargestellt werden, die in Abbildung 71 mit ihren Ausbeuten zusammengefasst sind.

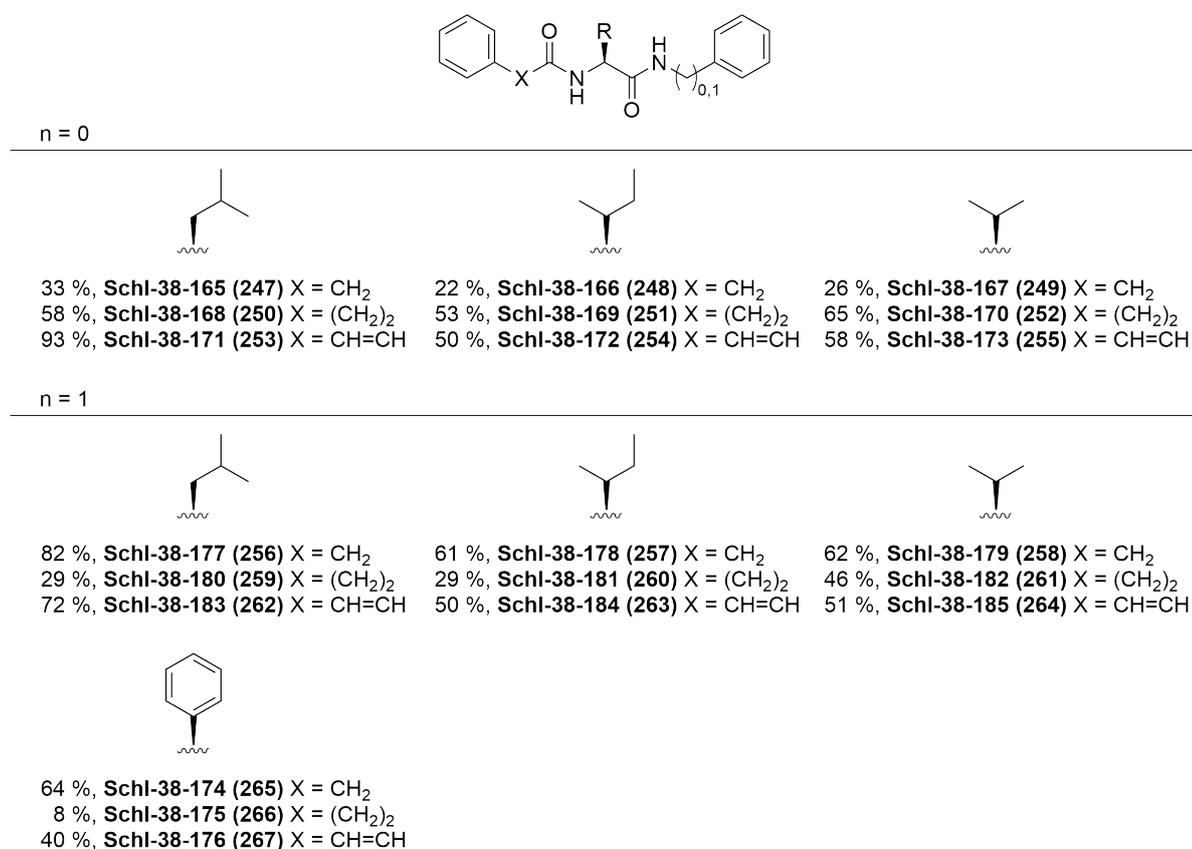


Abbildung 71: Dargestellte *N*-Acylaminosäureamide mit Modifikationen des Molekülteil C und ihre Ausbeuten.

Die Synthese wurde nach Schema 16 (S.89) durchgeführt und lieferte die Boc-geschützten Edukte in guten bis sehr guten Ausbeuten ($n = 0$: 78-99 %; $n = 1$: 66-86 %). Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe durch 4 M HCl in Dioxan verlief ebenfalls sehr gut oder quan-

titativ. Die Synthese der Zielverbindungen **Schl-38-165** bis **Schl-38-185** gelang mit unterschiedlich guten Ausbeuten mithilfe einer Kupplungsreaktion. Als Kupplungsreagenz wurde vorwiegend EDC/HOBt genutzt, nur bei **Schl-38-172** und **Schl-38-184** wurde HATU verwendet. Der Gebrauch von HATU wurde anschließend für den letzten Reaktionsschritt möglichst eingeschränkt, da sich die Entfernung des bei der Kupplung gebildeten Tetramethylharnstoffs durch eine Säulenchromatographie zum Teil problematisch gestaltete. Zum Erhalt des reinen Produkts war es nötig, in einem weiteren Reinigungsschritt das Produkt mit Wasser zu waschen. Bei den Phenylelessigsäure-Derivaten wurde hingegen eine nucleophile Substitution ausgehend vom Säurechlorid mit Triethylamin in DCM durchgeführt. Eine Schwierigkeit bei der Synthese bestand darin, dass die Verbindungen in einigen Fällen bei einer Wellenlänge von 254 nm nicht durch Fluoreszenzlöschung detektiert werden konnten. Tendenziell war eine Reinigung mittels MPLC geeigneter als eine manuelle Säulenchromatographie, da der Detektor der MPLC mehrere Wellenlängen gleichzeitig nutzt und dadurch eine sensiblere Detektion der Substanzen ermöglicht. Dennoch wurden alternativ Kaliumpermanganat- und Cer-Bäder zur Färbung der DC-Platten genutzt. Wenn alle Detektionsmethoden nicht erfolgreich waren, wurden die gesammelten Fraktionen einen Tag stehen gelassen, sodass nach dem Verdunsten eines Teils des Laufmittels das Produkt am nächsten Tag visuell identifiziert werden konnte.

Im Folgenden sind die Ergebnisse des DLA für die Derivate mit Modifikation des Molekülteil C mit einem *N*-Phenylamid-Rest im Molekülteil B zusammengefasst (Abbildung 72). Für alle Derivate der drei Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin mit einem Phenylelessigsäure-Rest, konnte eine starke Reduktion der Translationseffizienz von (AG)₁₅ beobachtet werden. Zu beachten ist, dass das Isoleucin-Derivat (**Schl-38-166**) bei einer niedrigeren Konzentration von 10 μM gemessen wurde als seine Leucin- (**Schl-38-165**) und Valin-Analoga (**Schl-38-167**). Es konnte eine unspezifische Hemmung von ca. 30-50 % ermittelt werden. Die Phenylpropionsäure- und Zimtsäure-Derivate aller drei Aminosäuren zeigten einen Verlust der Hemmung, wobei **Schl-38-173**, das Valin-Derivat mit einem Zimtsäure-Rest, eine starke Hochregulation der Translationseffizienz der beiden Messparameter bewirkte.

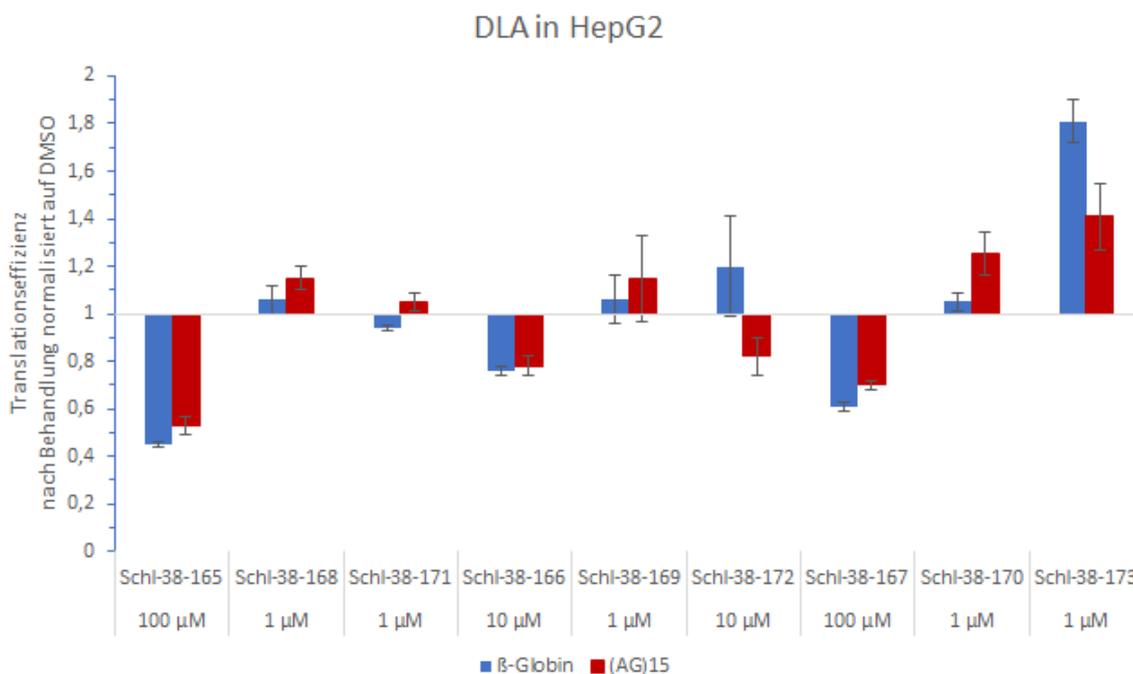


Abbildung 72: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene Verbindungen mit Modifikationen des Molekülteil C und einem *N*-Phenylamid-Rest zusammengefasst.

In der Serie mit dem *N*-Benzylamid-Rest wurde das Phenylglycin-Derivat mit einem Phenylpropionsäure-Rest (**Schl-38-175**) aufgrund seiner geringen Zytotoxizität nicht im DLA untersucht. Die Leucin-Derivate mit einem *N*-Benzylamid-Rest zeigten vielversprechende Ergebnisse im DLA. So konnte eine unspezifische Hemmung für das Phenylelessigsäure- (**Schl-38-177**, 64 % bei 100 μ M) sowie das Phenylpropionsäure-Derivat (**Schl-38-180**, 27 % bei 10 μ M) bestimmt werden. Zudem konnte für das Zimtsäure-Derivat (**Schl-38-183**) eine spezifische Hemmwirkung von 42 % bei einer Konzentration von 10 μ M festgestellt werden. Bei den Isoleucin-Derivaten mit einem *N*-Benzylamid-Rest konnte der gleiche Trend wie bei den Derivaten mit einem *N*-Phenylamid-Rest beobachtet werden. So zeigte nur das Derivat mit dem Phenylelessigsäure-Rest (**Schl-38-178**) einen unspezifischen Effekt auf die Translation. Wurden der Phenylpropionsäure- (**Schl-38-181**) oder der Zimtsäure-Rest (**Schl-38-184**) eingesetzt, führte dies zu einem kompletten Verlust der Hemmung. Bei den Valin-Derivaten verhielt es sich anders, da die Derivate mit einem Phenylelessigsäure- (**Schl-38-179**) oder einem Phenylpropionsäure-Rest (**Schl-38-182**) keinen Effekt zeigten, die Verbindung mit einem

Zimtsäure-Rest (**Schl-38-185**) hingegen einen leichten, aber spezifischen Effekt von 23 % auf die Translation ausübte. Die beiden Phenylglycin-Derivate (**Schl-38-174** und **Schl-38-176**) dagegen verursachten lediglich eine Hochregulation der Translationseffizienz von (AG)₁₅. Das entsprechende Phenylpropionsäure-Derivat (**Schl-38-175**) hingegen wurde aufgrund seiner fehlenden Zytotoxizität nicht gemessen.

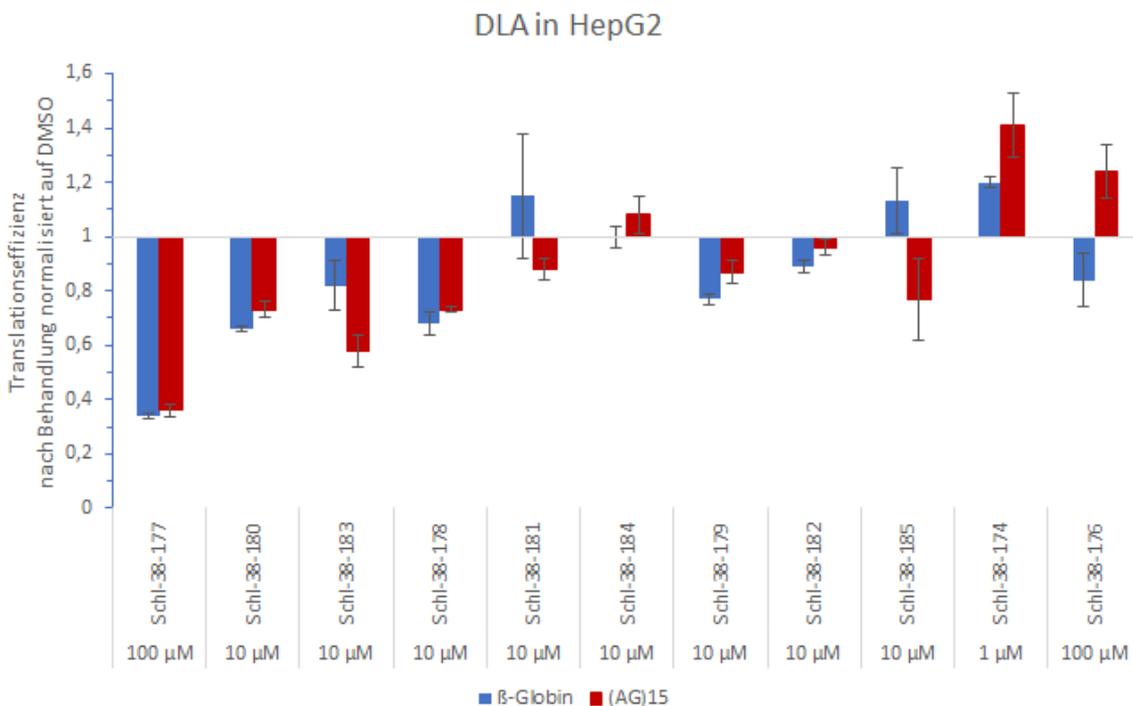


Abbildung 73: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene Verbindungen mit Modifikationen des Molekülteil C und einem *N*-Benzylamid-Rest zusammengefasst.

Die Modifikation des Molekülteil C war im Vergleich zu den Modifikationen der Molekülteile A und B im Hinblick auf eine Verbesserung der Hemmwirkung erfolgreicher und lieferte zwei sehr vielversprechende Verbindungen mit einem spezifischen inhibitorischen Effekt auf die Translation (Abbildung 74). Als Resultat wurden das Valin-Derivat **Schl-38-185** und das Leucin-Derivat **Schl-38-183** in der Arbeitsgruppe ZIEBUHR auf einen antiviralen Effekt gegen Coronaviren untersucht (siehe Kapitel 3.14, S.147).

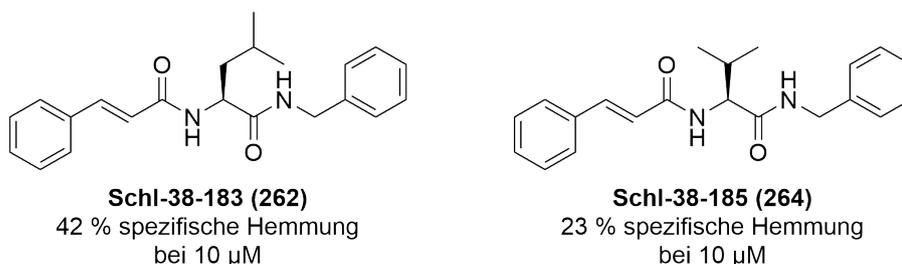


Abbildung 74: Derivate mit einer Modifikation des Molekülteil C, die eine vielversprechende spezifische Hemmung der Translationseffizienz im DLA gezeigt haben.

Synthese und biologische Testung weiterer Valin-Derivate

Nach der erfolgreichen biologischen Testung von **Schl-38-185**, das einen selektiven Hemmeffekt auf die Translationseffizienz und einen antiviralen Effekt bei einer Konzentration von 10 μM gezeigt hatte, wurden weitere Modifikationen der Molekülteile A und B der Valin-Derivate vorgenommen. In Abbildung 75 ist eine Übersicht der synthetisierten Derivate mit Modifikationen des Molekülteil A gezeigt, in Abbildung 76 mit Modifikationen des Molekülteil B. Es wurden EDGs und EWGs in alle drei Grundstrukturen (Phenyllessigsäure-, Phenylpropionsäure-, Zimtsäure-Struktur) eingeführt. Die Synthese erfolgte nach der in Schema 16 (S.89) gezeigten Route. Das die Subtasche B adressierende Strukturelement wurde in seinem Abstand zum Phenylglycin durch die Verwendung eines Phenyl- oder Benzylamid-Rests variiert.

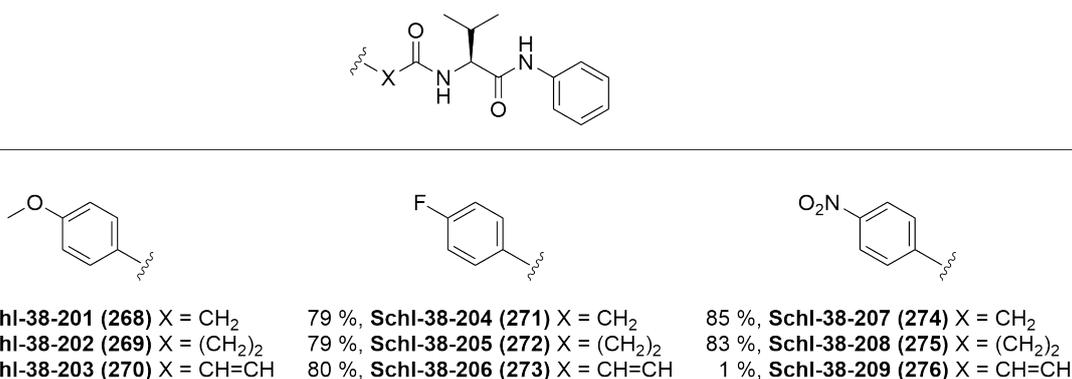
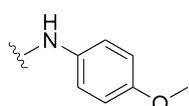
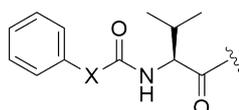
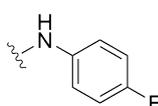


Abbildung 75: Dargestellte Valin-Derivate mit Modifikationen im Molekülteil A und ihre Ausbeuten.

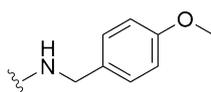
Die Synthese der Derivate mit der Modifikation im Molekülteil A gelang bis auf eine Ausnahme (**Schl-38-209**) problemlos. Bei **Schl-38-201** und **Schl-38-203** musste lediglich eine Umkristallisation aus Isopropanol durchgeführt werden, um das reine Produkt zu erhalten. Große Schwierigkeiten bereitete die Reinigung von **Schl-38-209**, da die Reinigung die mehrfache Verwendung der MPLC und der manuellen Säulenchromatographie erforderte. Dies spiegelt sich in der Ausbeute von 1 % wider.



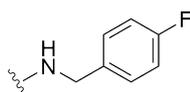
66 %, **Schl-38-186 (277)** X = CH₂
 68 %, **Schl-38-187 (278)** X = (CH₂)₂
 66 %, **Schl-38-188 (279)** X = CH=CH



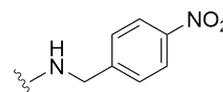
60 %, **Schl-38-189 (280)** X = CH₂
 81 %, **Schl-38-190 (281)** X = (CH₂)₂
 61 %, **Schl-38-191 (282)** X = CH=CH



34 %, **Schl-38-192 (283)** X = CH₂
 40 %, **Schl-38-193 (284)** X = (CH₂)₂
 15 %, **Schl-38-194 (285)** X = CH=CH



56 %, **Schl-38-195 (286)** X = CH₂
 61 %, **Schl-38-196 (287)** X = (CH₂)₂
 21 %, **Schl-38-197 (288)** X = CH=CH



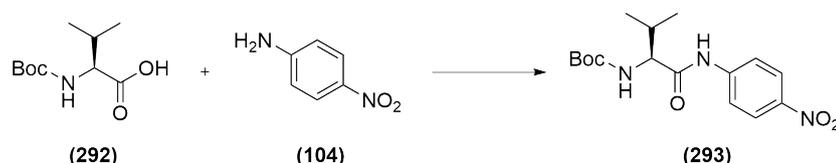
76 %, **Schl-38-198 (289)** X = CH₂
 76 %, **Schl-38-199 (290)** X = (CH₂)₂
 11 %, **Schl-38-200 (291)** X = CH=CH

Abbildung 76: Dargestellte Valin-Derivate mit Modifikationen im Molekülteil B und ihre Ausbeuten.

Die ersten beiden Schritte der Synthese zum Erhalt der Edukte mit der Modifikation im Molekülteil B verliefen problemlos mit Ausbeuten von 60-93 % für die Kupplung und quantitativen Ausbeuten für die Boc-Abspaltung. Die Kupplungsreaktion im letzten Schritt gelang mithilfe von EDC/HOBt und lieferte niedrige bis gute Ausbeuten. Bei **Schl-38-192**, **Schl-38-195** und **Schl-38-198** dagegen wurde eine nucleophile Substitution mit Phenylacetylchlorid durchgeführt. Insgesamt konnten die Zielverbindungen ohne große Probleme synthetisiert werden. Bei **Schl-38-198** bis **Schl-38-200** war eine zusätzliche Umkristallisation aus Isopropanol und bei **Schl-38-186** sowie **Schl-38-191** eine zweite säulenchromatographische Reinigung notwendig. Auch in dieser Serie bereitete im Falle zweier Verbindungen (**Schl-38-192** und **Schl-38-193**) die Detektion durch Fluoreszenzlöschung Schwierigkeiten.

Neben den in Abbildung 76 gezeigten Verbindungen sollte außerdem das 4-Nitroanilid-Derivat zur Adressierung der Subtasche B synthetisiert werden. Unerwartet ergaben sich hier große Schwierigkeiten in der ersten Stufe der Reaktion. Das gewünschte Edukt konnte nicht dargestellt werden. In Tabelle 10 sind alle getesteten Reaktionsbedingungen zusammengefasst.

Tabelle 10: Reaktionsbedingungen zur Darstellung der Ausgangssubstanz (**294**).



Versuch	Reaktionsbedingungen
1	HATU, DIPEA, DMF, 24 h, 0 °C \rightarrow RT
2	HATU, DIPEA, DMF, 48 h, 0 °C \rightarrow RT
3	EDC · HCl, HOBt, Et ₃ N, DCM, 24 h, 0 °C \rightarrow RT
4	HBTU, HOBt, DIPEA, DMF, 24 h, 0 °C \rightarrow RT
5	DCC, DMAP, DIPEA, THF, 24 h, 0 °C \rightarrow RT
6	PyBOB, DIPEA, DMF, 24 h, 0 °C \rightarrow RT
7	Oxalylchlorid, Toluol, 4.5 h, Reflux; K ₂ CO ₃ , 24 h, RT
8	<i>Is</i> o-Butylchloroformiat, <i>N</i> -Methylmorpholin, THF, 8 d, -15 °C \rightarrow RT

Im Versuch das gewünschte Edukt (**294**) zu erhalten, wurden unterschiedliche Kupplungsreagenzien für die Synthese getestet. Auch der Versuch einer Säureaktivierung mit Oxalylchlorid sowie die Anwendung der Mischanhydridmethode blieben erfolglos.

Bei den biologischen Testungen wurden einige der Verbindungen angesichts ihrer fehlenden Zytotoxizität im WST-1-Assay nicht weiter im DLA untersucht. Dazu gehörten vier Verbindungen mit einer Modifikation des Molekülteil A (**Schl-38-202**, **Schl-38-205**, **Schl-38-206**, **Schl-38-208**) und sechs Verbindungen mit Modifikationen des Molekülteil B (**Schl-38-188**, **Schl-38-192**, **Schl-38-193**, **Schl-38-195**, **Schl-38-196**, **Schl-38-198**). Alle anderen Verbindungen wurden im DLA bei einer Konzentration von 1 μ M oder 10 μ M gemessen. Abbildung 77 zeigt die Ergebnisse für die Derivate mit den Modifikationen des Molekülteil A und die Abbildungen 78 und 79 die für die Derivate mit einem *N*-Phenylamid- und einem *N*-Benzylamid-Rest im Molekülteil B.

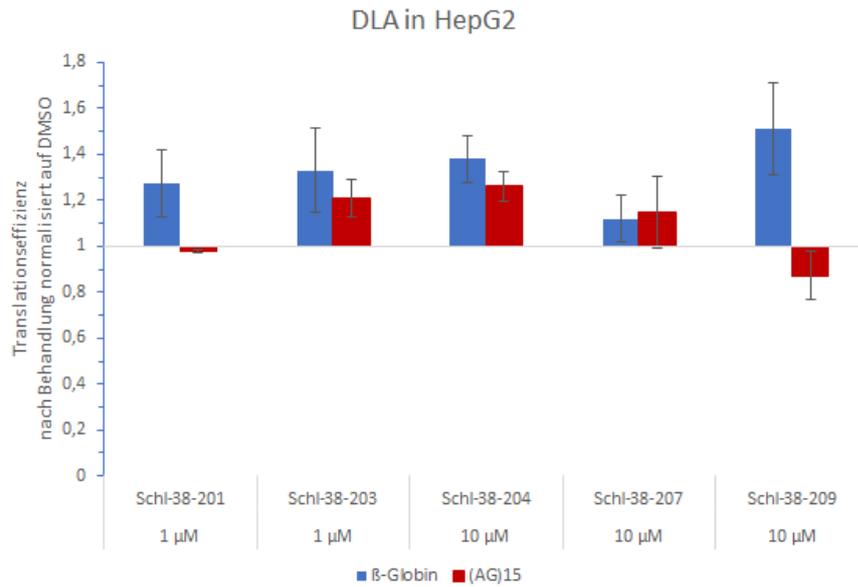


Abbildung 77: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene Valin-Derivate mit Modifikationen des Molekülteil A zusammengefasst.

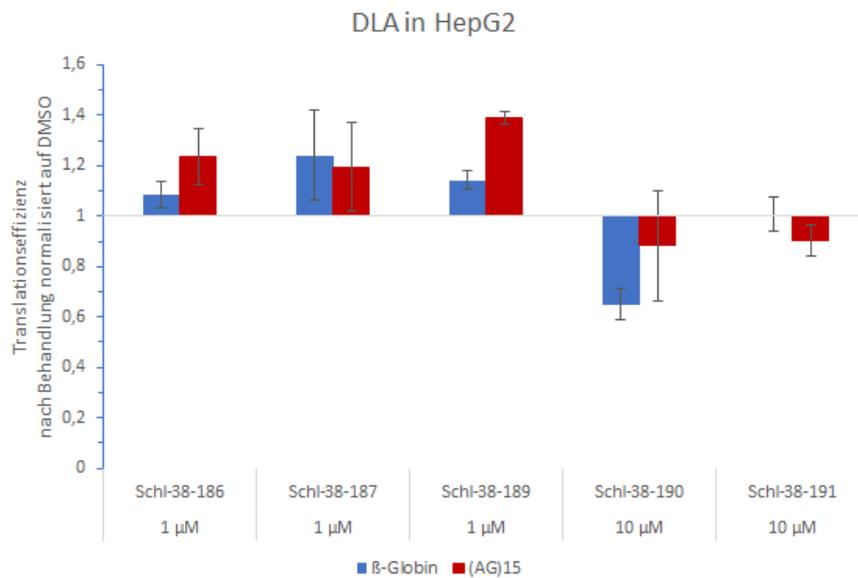


Abbildung 78: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene Valin-Derivate mit *N*-Phenylamid-Rest im Molekülteil B zusammengefasst.

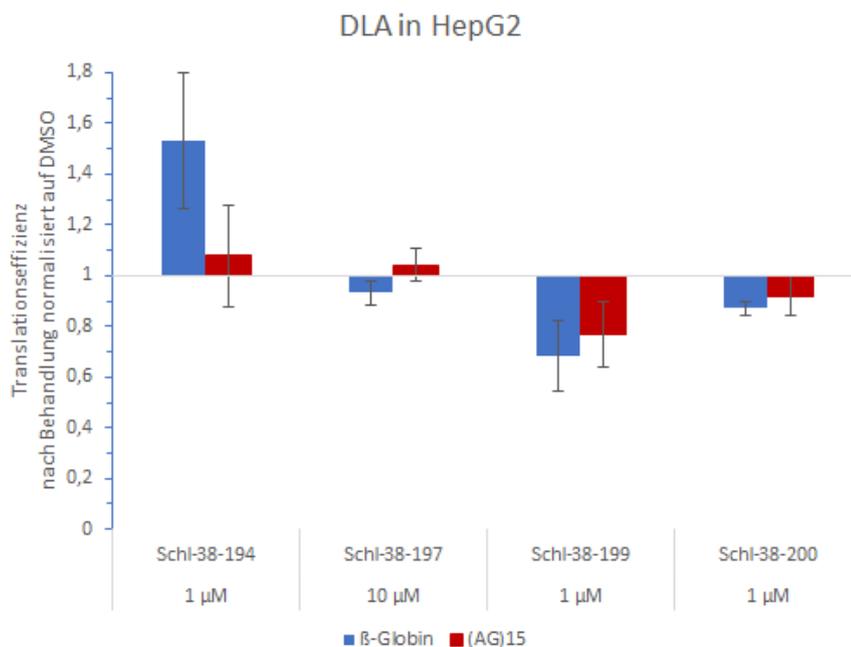


Abbildung 79: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene Valin-Derivate mit *N*-Benzylamid-Rest im Molekülteil B zusammengefasst.

In den drei Abbildungen ist zu sehen, dass keine Verbindung mit den vorgenommenen Modifikationen zu einer spezifischen Hemmung der Translation führte. Die meisten Verbindungen zeigten überhaupt keinen inhibitorischen Effekt oder tendenziell eher eine Hochregulation der Translationseffizienz von (AG)₁₅. Anzumerken ist noch die starke Hochregulation der Translationseffizienz von β-Globin bei **Schl-38-194** (*N*-Methoxybenzylamid-Rest im Molekülteil B) und **Schl-38-209** (Nitro-Rest im Molekülteil A).

Synthese und biologische Testung der D-Enantiomere

Um die Frage zu klären, ob die Konfiguration der bisher synthetisierten *N*-Acylaminosäureamide für die Adressierung der Bindetasche korrekt ist, sollten als Gegenstück ihre entsprechenden D-Enantiomere untersucht werden. Im Folgenden wurden die D-Enantiomere der Grundstrukturen (Phenyllessigsäure-, Phenylpropionsäure) und vor allem der Valin-Derivate untersucht. Die Synthese folgte der im Schema 16 (S.89) dargestellten Route und verlief in den ersten beiden Stufen mit sehr guten Ausbeuten. Eine Übersicht der Ausbeuten der dargestellten Verbindungen **Schl-38-107** bis **Schl-38-114** ist in Abbildung 80 gezeigt.

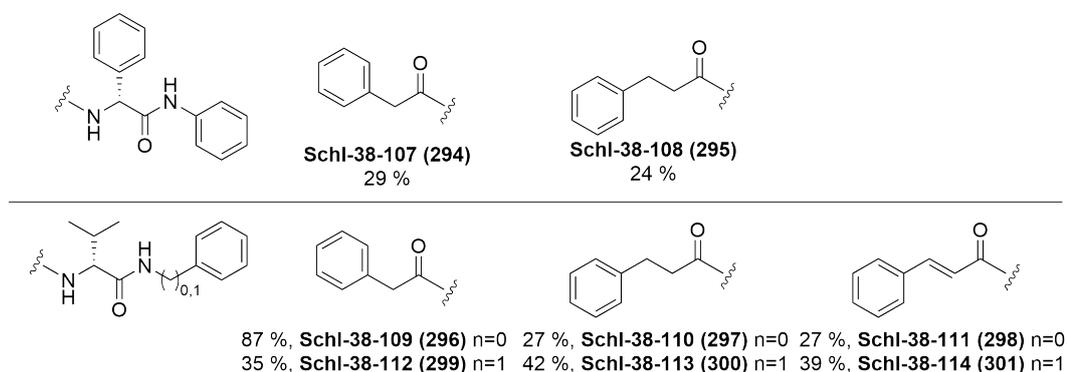


Abbildung 80: Dargestellte D-Enantiomere der *N*-Acylaminosäureamide und ihre Ausbeuten.

Bei der dritten Stufe waren die Ausbeuten tendenziell eher niedrig, obwohl die Synthese und Reinigung größtenteils problemlos verlief. Bei den Valin-Derivaten traten erneut die bereits oben in Kapitel 3.9.2 (S.107) beschriebenen Schwierigkeiten der Detektion des Produkts auf. Bei **Schl-38-114** war zudem eine zusätzliche Umkristallisation nötig, um ein reines Produkt zu erhalten. Angemerkt sei, dass an dieser Stelle das D-Enantiomer des *N*-Cinnamoylphenylglycins nicht synthetisiert wurde, da das entsprechende L-Enantiomer nicht wasserlöslich war und folglich keine biologische Testung vorgenommen werden konnte. Die zwei D-Phenylglycin-Derivate (**Schl-38-107** und **Schl-38-108**) ebenso wie ein Phenylpropionsäure-Derivat des D-Valins (**Schl-38-110**) wurden aufgrund ihrer fehlenden Zytotoxizität im WST-1-Assay nicht im DLA untersucht. Die Ergebnisse der übrigen D-Enantiomere sind in Abbildung 81 abgebildet.

Aus den dort abgebildeten Ergebnissen geht deutlich hervor, dass der Großteil der Verbindungen keinen inhibitorischen Effekt auf die Translation ausübt. **Schl-38-112**, das Phenyllessigsäure-Derivat des D-Valins mit Phenylamid-Struktur, führte sogar zu einer starken Hochregulation der Translationseffizienz von (AG)₁₅. Allein Verbindung **Schl-38-114**, das Zimtsäure-Derivat des D-Valins mit einer Benzylamid-Struktur, bewirkt eine spezifische Hemmwirkung von 35 %. Um das Potential dieser Verbindung besser einschätzen zu können, sind aber weitere biologische Testungen nötig. So wäre die Testung auf einen antiviralen Effekt sinnvoll für die weitere Optimierung der Stoffklasse.

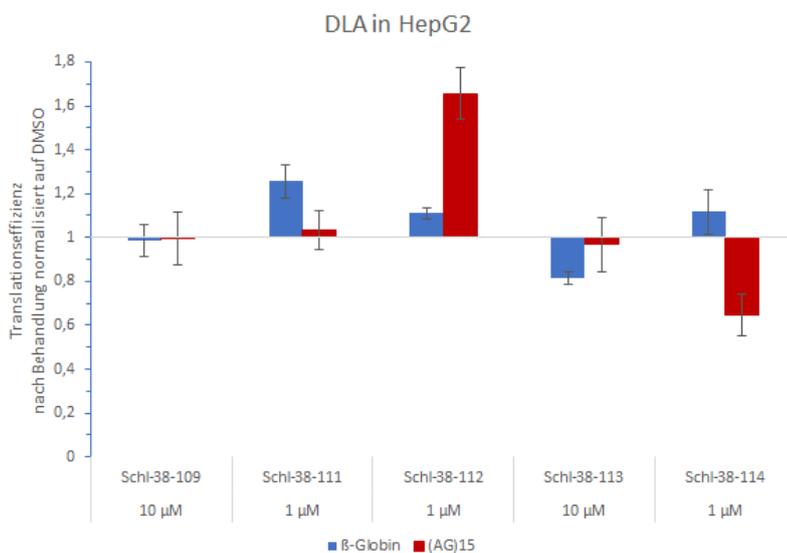


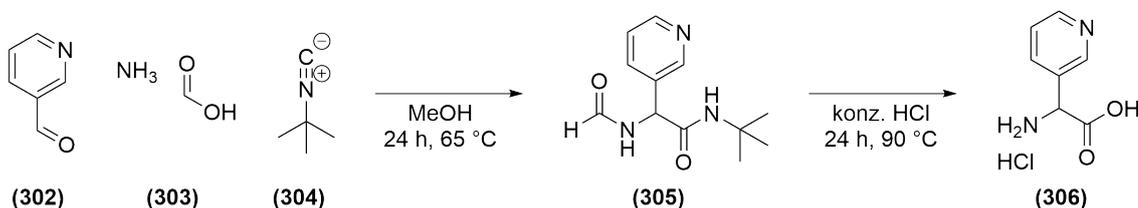
Abbildung 81: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für die D-Enantiomere der *N*-Acylaminosäureamide zusammengefasst.

3.10 Derivate nicht-proteinogener Aminosäuren

3.10.1 Synthese der nicht-proteinogenen Aminosäuren

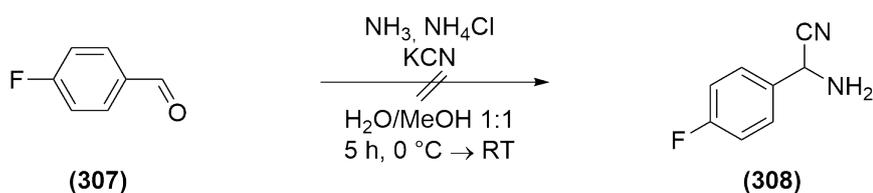
Die Synthese der nicht-proteinogenen Aminosäuren stellte einen wichtigen Meilenstein in der Eröffnung einer Vielzahl neuer Struktur motive für die Tasche C dar und sollte in dieser Dissertation etabliert werden. Im Folgenden wurden drei verschiedene Methoden zur Darstellung von Aminosäuren getestet.

Die Darstellung der nicht-proteinogenen Aminosäure (**306**) mit einem Pyridyl-Rest war nach Anleitung des Patents (WO 03/010130 A1)^[87] erfolgreich (Schema 18). Es handelt sich um eine UGI-Reaktion, bestehend aus vier Komponenten. Dabei wurden der Aldehyd (**302**), Ammoniumformiat (**303**) und *tert*-Butylcyanid (**304**) in einer *one-pot*-Reaktion umgesetzt. Anschließend erfolgte die saure Hydrolyse zur Aminosäure. Die große Schwierigkeit in der Synthese lag in der Aufarbeitung des Produkts. Es waren mehrere Anläufe und Optimierungen nötig, bis die freie Aminosäure nach der Hydrolyse mit einer zufriedenstellenden Reinheit vorlag. Bei dem Pyridyl-Derivat war entscheidend, bei der "Umkristallisation" aus MeOH/DEE (1:1) den sich nicht lösenden Feststoff zu filtrieren und zu trocknen. Das Filtrat, aus dem normalerweise das reine Produkt ausfallen sollte, wurde verworfen. Somit handelte es sich nicht um eine Umkristallisation, sondern um einen Waschschr it. Auffällig war, dass im ¹H-NMR gelegentlich ein prägnantes Triplet bei 7.41 ppm zu sehen war, das wahrscheinlich durch eine nicht identifizierbare Verunreinigung verursacht wurde. Dieses konnte jedoch durch mehrfaches Waschen aus dem Produkt entfernt werden. So konnte die reine Pyridylglycin mit einer Ausbeute von 6 % erhalten werden.



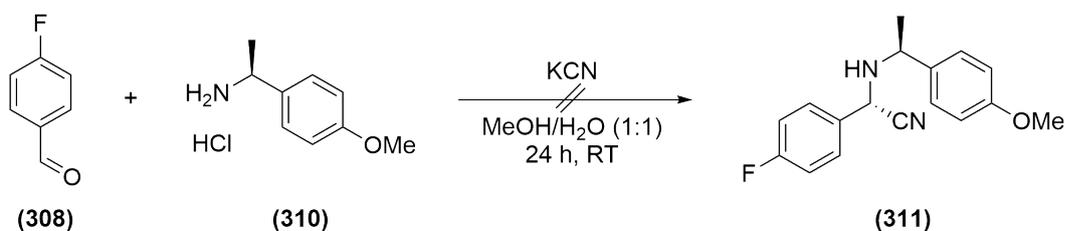
Schema 18: Synthese der nicht-proteinogenen Aminosäuren mittels UGI-Reaktion.

Parallel zur ersten Methode wurde eine STRECKER-Synthese nach einer Standard-Vorschrift aus dem Organikum (Schema 19) für ein Phenylglycin-Derivat mit einem *para*-Fluor-Substituenten durchgeführt.^[88] Hierbei wurde der Aldehyd (**307**) mit Ammoniak, Ammoniumchlorid und Kaliumcyanid zur Reaktion gebracht, um das α -Aminonitril (**308**) zu erhalten. Im zweiten Schritt der STRECKER-Synthese hätte eine saure Hydrolyse des α -Aminonitrils erfolgen sollen, um die freie Aminosäure als Racemat zu erhalten. Da die Synthese bereits im ersten Schritt nicht erfolgreich war, wurde sie verworfen und der zweite Schritt nicht mehr durchgeführt.



Schema 19: Synthese der nicht-proteinogenen Aminosäuren mittels STRECKER-Synthese.

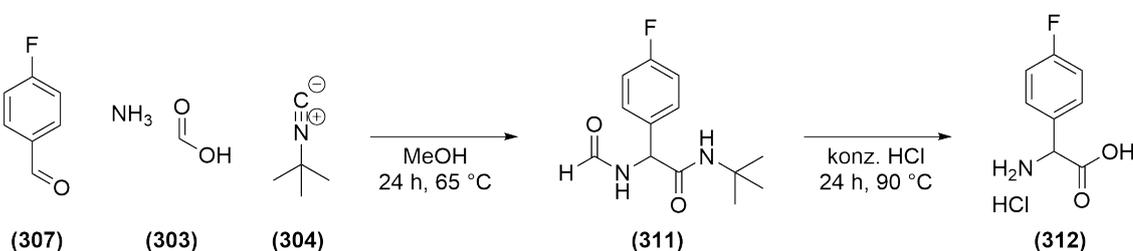
Als alternative Methode wurde zudem eine asymmetrische STRECKER-Synthese mit dem chiralen Auxiliar ((*S*)-1-(4-Methoxyphenyl)ethylamin) (**309**) zur Synthese der Aminosäure durchgeführt (Schema 20).^[89] Doch auch hier war kein Umsatz zum α -Aminonitril (**310**) zu beobachten. Es konnten nur das Signal für das gebildete Imin im Massenspektrum sowie zahlreiche andere Signale gefunden werden.



Schema 20: Enantioselektive Synthese der nicht-proteinogenen Aminosäuren mithilfe eines chiralen Katalysator.

Zuletzt konnte eine weitere freie Aminosäure mit der *para*-Fluor Substitution mittels der UGI-Reaktion synthetisiert werden (Schema 21). Selbst nach der erfolgreichen Synthese des Pyridyl-Analogons blieb die Reinigung dieses Derivats anspruchsvoll. Bei diesem Fluor-Derivat war das Produkt im Gegensatz zum Pyridylglycin-Derivat nach der Umkristallisation aus

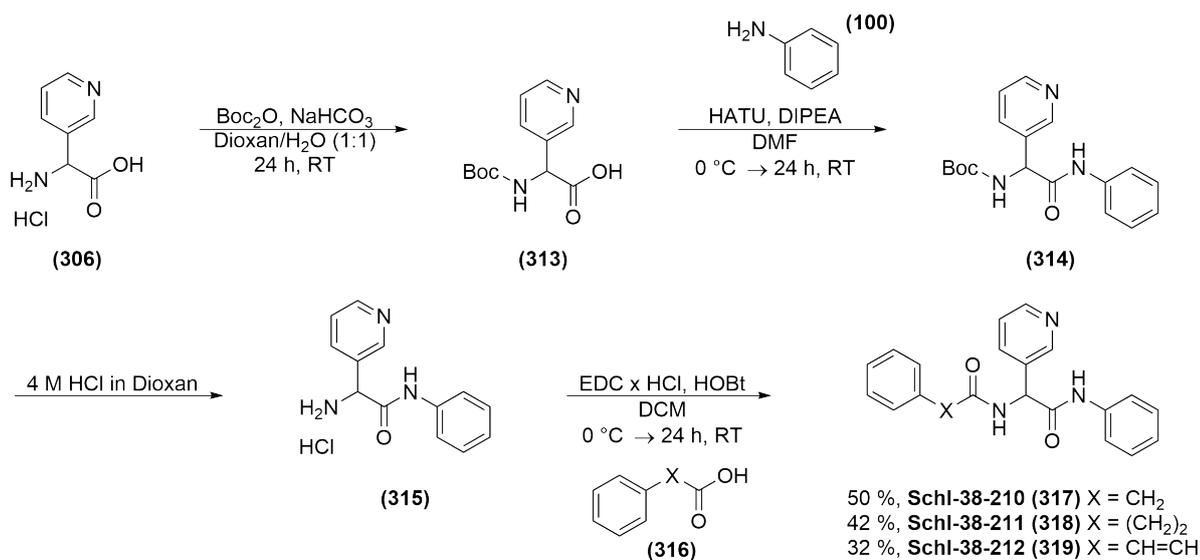
MeOH/DEE (1:1) im Filtrat zu finden. Bei dem nicht-löslichen Feststoff handelte es sich um die Substanz, die für das bereits oben erwähnte Triplett bei 7.41 ppm im $^1\text{H-NMR}$ verantwortlich war. Da aus dem Filtrat jedoch kein Produkt ausfiel, wurde dieses eingeeengt. Der gewonnene Feststoff zeigte indes in der Analytik zu viele Signale im $^1\text{H-}$ und $^{13}\text{C-Spektrum}$ und wurde folglich ein weiteres Mal aus Isopropanol umkristallisiert. Nach dem gemessenen Massenspektrum war der farblose, ausgefallene Feststoff nicht die gewünschte Aminosäure. Die Aminosäure konnte nach der Entfernung des Lösungsmittels aus dem Filtrat als beige-oranger Feststoff erhalten werden. Die analytische Charakterisierung dieses beige-orangen Feststoffs ergab allerdings, dass eine präparative Reinigung mittels HPLC nötig war, um das reine Produkt zu erhalten. Problematisch gestaltete sich hierbei, dass die freie Aminosäure eine so hohe Polarität aufwies, dass sie direkt im Einspritzpeak der HPLC von der Säule eluierte und so keine Trennung erfolgen konnte. Bei der Vorbereitung der präparativen HPLC fiel auf, dass sich ein Teil des Feststoffs nicht in dem Wasser/Acetonitril-Gemisch mit 0.1 % TFA löste. Dieser braune Feststoff wurde ebenfalls analysiert und stellte sich als das gewünschte Produkt mit einer Reinheit von 94 % heraus. Die Reinigung des Produkts war langwierig und sehr aufwendig, sodass eine Optimierung der Synthese in Hinblick auf ihre Reinigung und ein Upscaling hin nötig ist.



Schema 21: Synthese der nicht-proteinogenen Aminosäuren mit der *para*-Fluor Substitution am Phenylrest.

Nach der erfolgreichen Etablierung der Aminosäuren Synthese konnten die Zielverbindungen mit den drei Grundstrukturen (Phenyllessigsäure-, Phenylpropionsäure, Zimtsäure-Struktur) im Molekülteil A für das Pyridylglycin-Derivat dargestellt werden. In Schema 22 sind die anschließenden vier Stufen der Syntheseroute gezeigt. Zunächst erfolgte die Einführung der Boc-Schutzgruppe, die nur mit einer geringen Ausbeute von 19 % gelang. Dieser Schritt be-

darf weiterer Optimierungen für Ansätze im größeren Maßstab. Danach verlief die Synthese nach dem bereits oben beschriebenen Syntheseweg mit einer Kupplungsreaktion mit HATU und einer Boc-Abspaltung mit HCl in Dioxan mit nahezu quantitativen Ausbeuten. Abschließend konnten die Verbindungen **Schl-38-210** bis **Schl-38-212** mithilfe einer Kupplung mit EDC/HOBt erhalten werden. Die Ausbeuten waren hier moderat, da bei allen drei Verbindungen neben der säulenchromatographischen Reinigung zusätzlich eine Umkristallisation aus Isopropanol erfolgte.



Schema 22: Syntheseweg der Pyridylglycin-Derivate.

3.10.2 Biologische Ergebnisse der Derivate nicht-proteinogenen Aminosäuren

Die Phenylacetyl- (**Schl-38-210**) und Phenylpropionylpyridylglycin-Derivate (**Schl-38-211**) wiesen bei der biologischen Untersuchung im WST-1-Assay weder bei einer Konzentration von 100 μM noch von 10 μM eine Zytotoxizität auf. Folglich wurden beide Verbindungen anschließend nicht im DLA gemessen. Einzig das Zimtsäure-Derivat **Schl-38-212** wurde im DLA getestet, zeigte jedoch keinen inhibitorischen Effekt auf die Translation (Abbildung 82).

DLA in HepG2 bei 10 μM

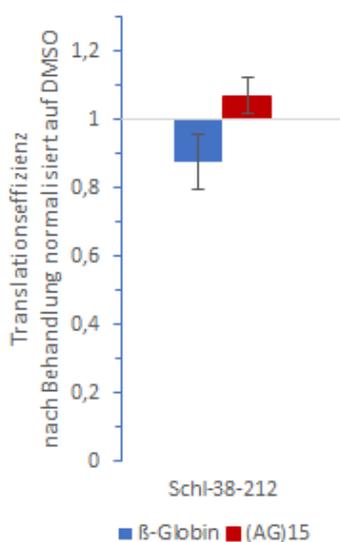


Abbildung 82: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen von **Schl-38-212**.

Aus diesen Daten kann vermutet werden, dass die nicht im DLA getesteten Phenyllessigsäure- (**Schl-38-210**) und Phenylpropionsäure-Derivate (**Schl-38-211**) ebenfalls keine Hemmwirkung besitzen. Alles in allem bietet die Verwendung der nicht-proteinogenen Aminosäuren als Grundbaustein viele Möglichkeiten, den potentiellen Inhibitor speziell auf die erforderlichen Gegebenheiten der Subtasche C anzupassen. In diesem ersten Versuch jedoch führte dies zum Verlust des inhibitorischen Effekts. Da für die die Subtasche C adressierenden Struktur motive jedoch noch einige Möglichkeiten der Optimierung bestehen, gibt es noch viel Spielraum zur Verbesserung der Hemmwirkung.

3.10.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der *N*-Acylaminosäureamide

Nach der umfangreichen Untersuchung der Stoffklasse der *N*-Acylaminosäureamide durch verschiedene Modifikationen in den Molekülteilen A, B und C konnten schlussendlich sechs Verbindungen identifiziert werden, die einen spezifischen inhibitorischen Effekt auf die Translation haben (Abbildung 83).

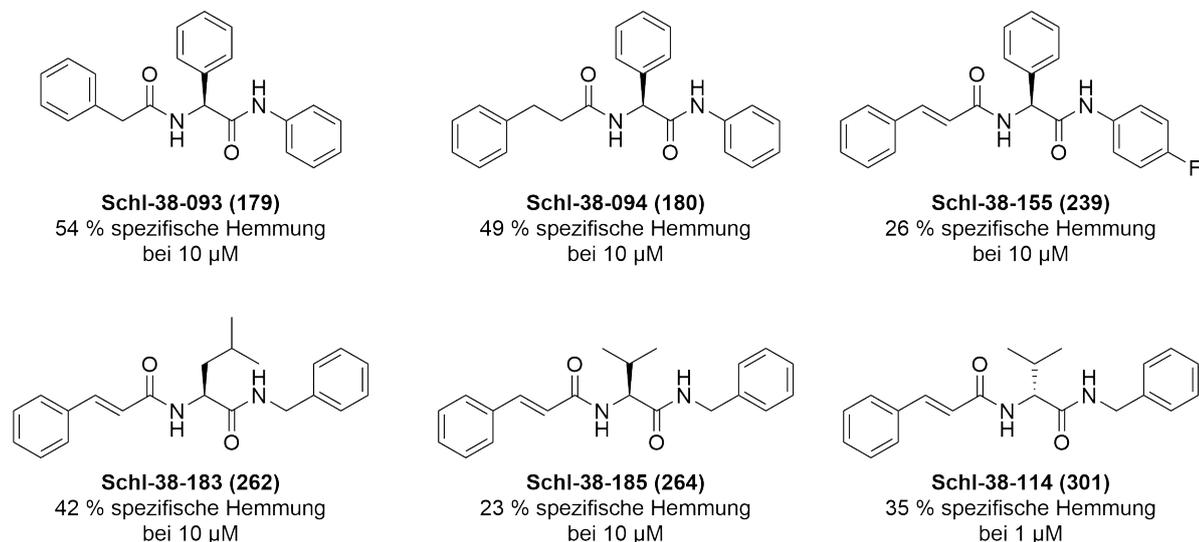


Abbildung 83: Übersicht der Verbindungen aus der Stoffklasse der *N*-Acylaminosäureamide mit einem spezifischen Hemmeffekt auf die Translation.

Von den wirksamsten Verbindungen verfügten drei über einen Phenylglycin-Rest im Molekülteil C. Folglich wurden die Grundstrukturen mit einem Phenyllessigsäure-, Phenylpropionsäure- und Zimtsäure-Rest als Strukturmotiv A hinsichtlich ihrer verschiedenen Molekülteile weitreichend variiert. Bei einer Konzentration von 10 μ M erzielte das Fluor-Derivat **Schl-38-155** einen moderaten inhibitorischen Effekt auf die Translation von 26 %. Die stärkste Hemmwirkung wurde durch **Schl-38-093** mit 54 % bei einer Konzentration von 10 μ M erreicht. Auch **Schl-38-094** und **Schl-38-183** mit einem Leucin-Strukturmotiv im Molekülteil C führten zu einer ausgeprägten Hemmung der Translation von über 40 %. Leider zeigten die vier genannten Verbindungen in weiteren biologischen Testungen keinen antiviralen Effekt gegen Coronaviren (siehe Kapitel 3.14, 147). Bei den letzten beiden Verbindungen handelte es sich um Valin-Derivate mit unterschiedlichen Konfigurationen. Das L-Enantiomer **Schl-38-185** wies eine Hemmung der Translationseffizienz von 23 % bei einer Konzentration von 10 μ M auf.

Zudem zeigte es einen antiviralen Effekt gegen HCoV-229E. Dieses Valin-Derivat birgt folglich noch sehr viel Potential, sodass sie als Grundlage für eine weitere Masterarbeit von FELIX KOCH (Arbeitskreis Schlitzer, Philipps-Universität Marburg) diene. Das entsprechende D-Valin-Enantiomer zeigte sogar bei einer Konzentration von nur 1 μM eine spezifische Hemmung der Translation von 35 %. Dies ist signifikant höher als bei dem L-Enantiomer und bietet auch hier noch viel Raum für weitere Entwicklungen. In Falle des D-Enantiomers steht jedoch noch die biologische Untersuchung auf einen antiviralen Effekt aus.

Abschließend kann geschlussfolgert werden, dass die Entwicklung der Stoffklasse der *N*-Acylaminosäureamide erfolgreich war. Aus dem Struktur-basierten Ansatz sind aus 121 Verbindungen sechs vielversprechende Derivate mit einer spezifischen Hemmung der Translation hervorgegangen. Darüber hinaus gibt es noch vielfältige Entwicklungsmöglichkeiten, die in weiteren Arbeiten untersucht werden können.

3.11 Verzweigung der linearen Sulfonamide

3.11.1 Idee und Entwicklung der verzweigten Sulfonamide

Nach der Publikation der Kristallstruktur von eIF4A^[66] erfolgte eine Reevaluation der Stoffklasse der linearen Sulfonamide sowie der propellerartigen Sulfonamide hinsichtlich ihrer Bindungsmodi in der Helikase-Bindetasche. Die bisher synthetisierten Derivate aus den drei Stoffklassen wurden mittels molekularem Docking untersucht und ihre Dockingposen in der Helikase-Bindetasche visuell ausgewertet. Im Folgenden werden die aus diesem Docking gewonnenen Erkenntnisse sowie die daraus resultierenden Ideen für eine Weiterentwicklung der Sulfonamide genauer beschrieben.

Docking der linearen Sulfonamide

Als Erstes wurden alle in dieser Arbeit synthetisierten linearen Sulfonamide in die Kristallstruktur der humanen Helikase eIF4A (PDB: 5ZC9)^[66] gedockt. Wie nicht anders zu erwarten war, stellte sich dabei heraus, dass sich das lineare Sulfonamid nur zwei Subtaschen der Helikase-Bindetasche adressiert. Es sind nur zwei denkbare Bindungsposen aus dem molekularen Docking hervorgegangen. Im Folgenden werden die Dockingposen exemplarisch an zwei linearen Sulfonamiden (**Schl-38-012** und **Schl-38-049**) gezeigt (Abbildung 84). Bei der ersten Bindungspose (Abbildung 84a) lag der *N*-Benzylsulfonamid-Rest in der Subtasche B und der Isonicotinoyl-Rest in der Subtasche A. In der zweiten Bindungspose (Abbildung 84b) adressierte der *N*-Phenylsulfonamid-Rest die Subtasche A und der Isonicotinoyl-Rest die Subtasche C. In allen Fällen war die Subtasche A immer besetzt und weitreichend gefüllt, während entweder die Subtaschen B oder C besetzt waren. Die Subtasche C blieb jedoch häufiger unbesetzt und wurde nur bei etwa 29 % der Dockingposen durch das lineare Sulfonamid adressiert. Dies war tendenziell häufiger bei den Sulfonamiden mit *N*-Phenylsulfonamid-Rest- und selbst bei diesen nur teilweise - oder bei linearen Sulfonamiden mit einem großen Substituenten zu beobachten. Bei Letzteren legten sie sich mit den langen Substituenten eher in die Tasche A. In Abbildung 84a ist an **Schl-38-012** exemplarisch die häufigste Dockingpose der linearen Sulfonamide und in Abbildung 84b die seltenere Dockingpose mit **Schl-38-049** gezeigt.

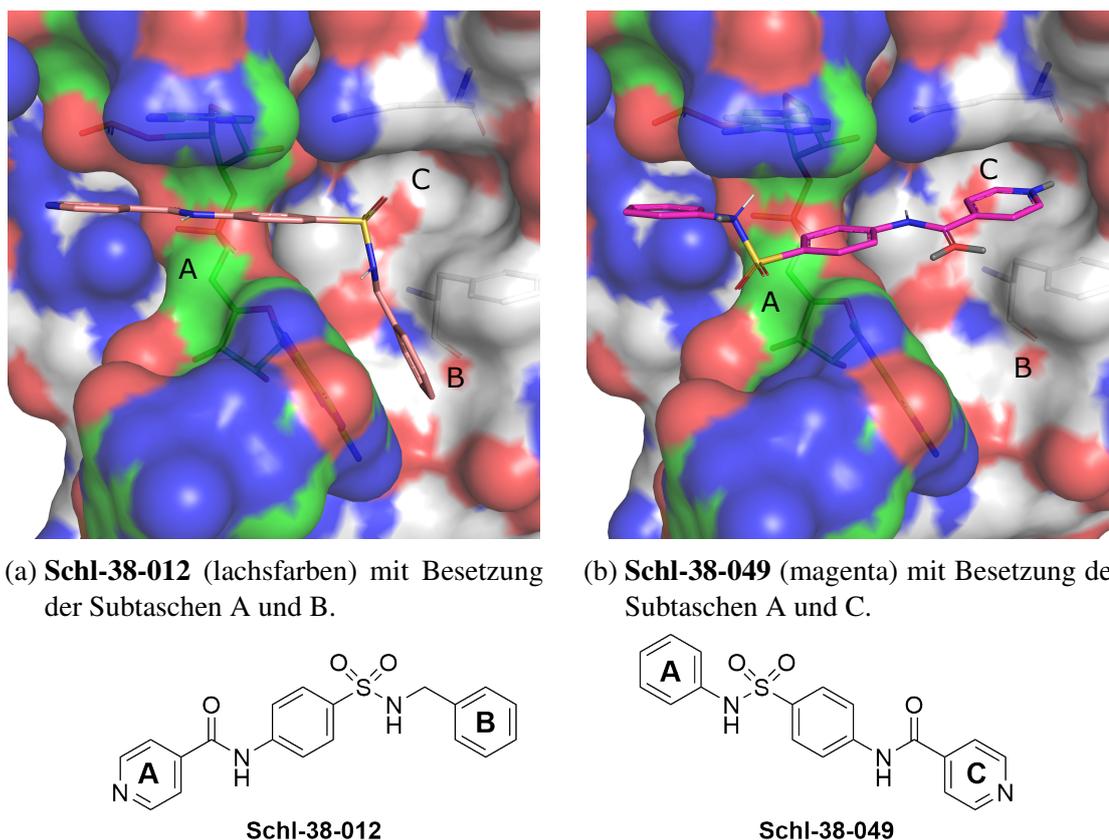


Abbildung 84: (a) und (b) Exemplarische Dockingposen der linearen Sulfonamide (lachsfarben und magenta) in der Kristallstruktur des eIF4A-RNA-Komplexes (PDB:5ZC9)^[66]. Es erfolgt eine unterschiedliche Besetzung der Subtaschen, wobei eine Subtasche immer unbesetzt bleibt.

Aus dem molekularem Docking der linearen Sulfonamide wird deutlich, dass eine Subtasche, sei es die Subtasche B oder C, immer unbesetzt bleibt. Folglich wurden nicht alle in der Bindetasche möglichen Wechselwirkungen durch die linearen Sulfonamide für eine Bindung genutzt. Der nächste Schritt bestünde in der Entwicklung eines zusätzlichen Strukturmotivs, das die fehlende Subtasche optimal ausfüllen könnte.

Docking der propellerartigen Sulfonamide

Die propellerartigen Sulfonamide entstammen, wie oben schon beschrieben, einem Ligandenbasierten Design und ahmen mit ihren drei aromatischen Ringen die räumliche Struktur von RocA nach. Das bei den linearen Sulfonamiden fehlende Strukturelement zur Besetzung einer dritten Subtasche sollte bei den Derivaten dieser Stoffklassen vorhanden sein. Diese Hypo-

these konnte mithilfe des molekularen Dockings bestätigt werden. Alle drei Subtaschen A, B und C werden durch das propellerartige Sulfonamid ausgefüllt. In Abbildung 85 ist beispielhaft eine Dockingpose für das propellerartige Sulfonamid **Schl-38-063** gezeigt. Alle signifikanten Wechselwirkungen werden durch die drei aromatischen Ringe in Form von π - π -Wechselwirkungen adressiert und ein Sulfonamid-Sauerstoff bildet eine Wasserstoffbrücke zu Gln195 aus. Die Subtasche A wird bei den propellerartigen Sulfonamiden jedoch nur zu einem kleinen Teil ausgefüllt, da der Phenylsulfonamid-Rest nicht vollständig über dem RNA-Strang liegt.

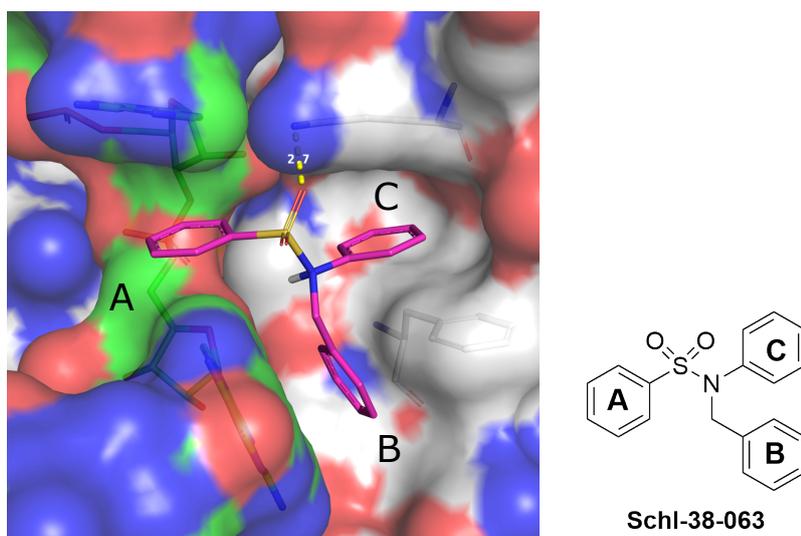


Abbildung 85: Dockingpose eines propellerartigen Sulfonamids (**Schl-38-063** in magenta) in der Kristallstruktur des Helikase-Komplexes (PDB:5ZC9)^[66]. Die Subtasche A wird nur zum Teil ausgefüllt und die π - π -Wechselwirkungen zu den zwei Basen der RNA sowie Phe163 werden ausgebildet. Der Abstand zwischen dem Sulfonamid und Gln195 beträgt 2.7 Å, sodass eine Wasserstoffbrücke (gelb) ausgebildet werden kann.

Wird die Struktur der linearen Sulfonamide als Basis genommen und durch einen zusätzlichen Phenylrest am Sulfonamid-Stickstoff ergänzt, entwickelt sich daraus die neue Stoffklasse der verzweigten Sulfonamide, die nunmehr alle drei Subtaschen A, B und C adressieren kann und die Subtasche A zu einem weit größerem Teil ausfüllen kann (Abbildung 86).

In Abbildung 87 ist exemplarisch eine Dockingpose für ein verzweigtes Sulfonamid gezeigt. Die in den drei Strukturelementen A, B und C enthaltenen aromatischen Ringe gehen π - π -

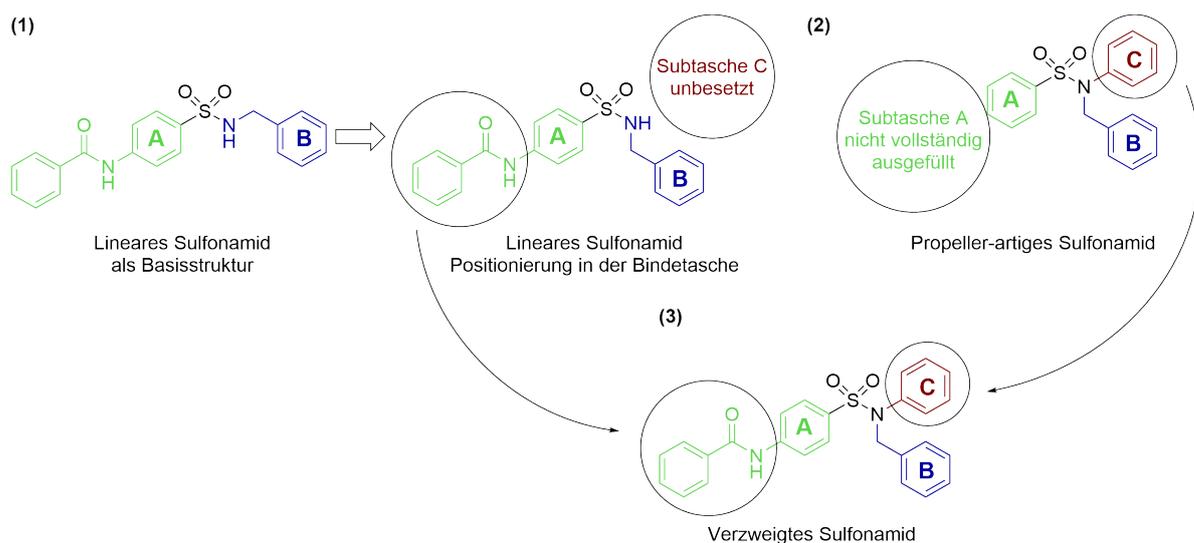


Abbildung 86: Entwicklung der Stoffklasse der verzweigten Sulfonamide: (1) Lineare Sulfonamide als Basisstruktur: Ein Strukturmotiv zur Adressierung der Subtasche C fehlt. (2) Propellerartige Sulfonamide besetzen alle drei Subtaschen. Die Kombination der Strukturelemente liefert die verzweigten Sulfonamide, die alle drei Subtaschen ganz (auch B, C) oder weitgehend (A) ausfüllen.

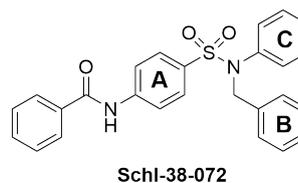
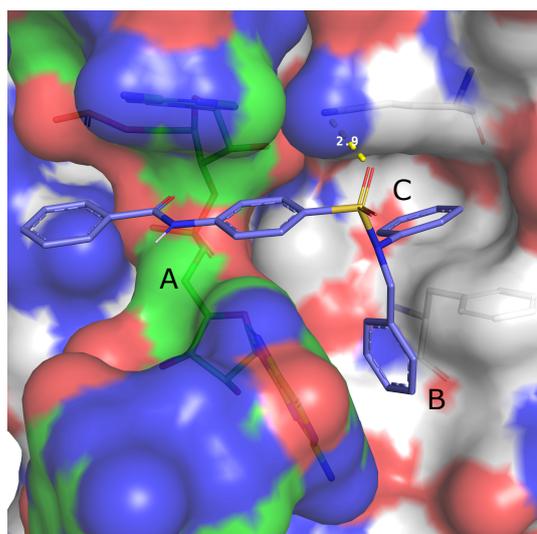
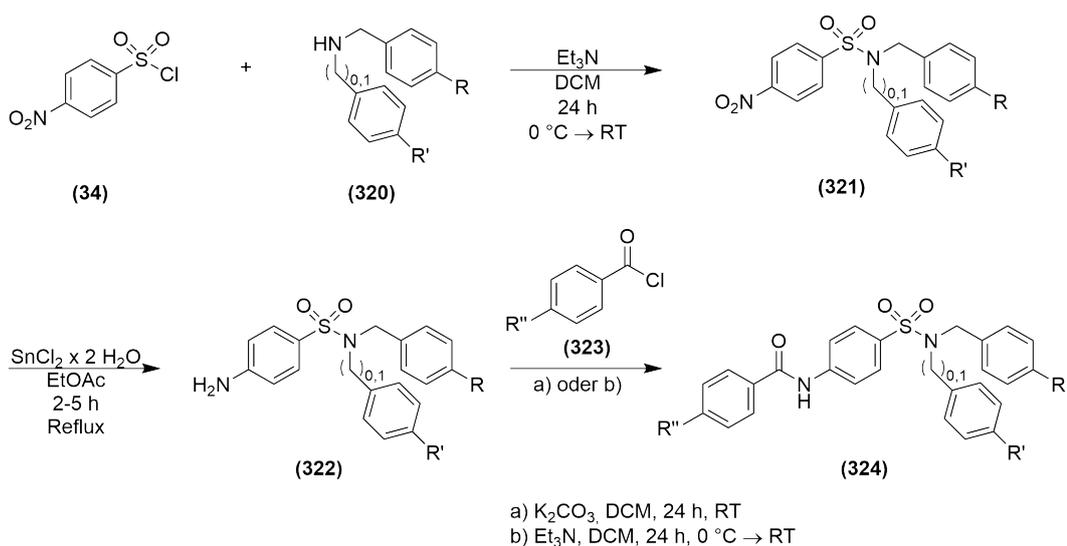


Abbildung 87: Dockingpose eines verzweigten Sulfonamids (**Schl-38-072** in blau) in der Kristallstruktur des eIF4A-RNA-Komplexes (PDB:5ZC9)^[66]. Die π - π -Wechselwirkungen zu den RNA-Basen A7 und G8 sowie dem Phe163 werden adressiert. **Schl-38-072** bildet eine Wasserstoffbrücke mit einem Abstand von 2.9 Å zu Gln195 aus. Zudem wird durch den zweiten Phenylrest in der Subtasche A ein ähnlicher klammerartiger Effekt wie bei Silvestrol vermutet.

Wechselwirkungen mit den Basen A7 und G8 sowie Phe163 ein. Auch der Abstand von 2.9Å zwischen dem Sulfonamid-Sauerstoff und dem Gln195 ermöglicht die Bildung einer Wasserstoffbrücke. Darüber hinaus zeigt die Dockingpose klar, dass der zusätzliche zweite Phenylrest im Strukturelement A die Subtasche A weitgehend ausfüllt. So könnte der starke klammerartige Effekt von Silvestrol imitiert werden, indem der zusätzliche Ring vollständig über die RNA ragt und diese festklemmt. Nach der visuellen Evaluation der Dockingposen der verzweigten Sulfonamide kann diese Stoffklasse als vielversprechend eingeordnet werden, da sie durch die bessere Ausfüllung der drei Subtaschen die fehlende Affinität und eventuell Selektivität der linearen und propellerartigen Sulfonamide ausgleichen könnte. Im Folgenden sollen erste Derivate dieser Stoffklasse synthetisiert werden. Diese Derivate sollten durch die Einführung von EWGs und EDGS in ihren elektronischen Eigenschaften modifiziert werden. Während einer der Substituenten am Sulfonamid-Stickstoff immer ein (substituierter) Benzylrest war, wurden sowohl (substituierte) Phenyl- als auch Benzylrest als zweiter Substituent verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit entstanden so zehn Derivate der verzweigten Sulfonamide.

3.11.2 Synthese der verzweigten Sulfonamide

Die Darstellung der verzweigten Sulfonamide erfolgte nach der von PATRICK MENZEL verwendeten Vorschrift in einer dreistufigen Synthese aus dem 4-Nitrobenzensulfonylchlorid (**34**) und einem sekundären Amin (Schema 23, S.130). War das sekundäre Amin käuflich nicht erhältlich, wurde dieses in einem vorausgehenden Schritt synthetisiert (siehe Kapitel 3.4.2, S.63). Der erste Schritt der Synthese bestand aus einer nucleophilen Substitution am Sulfonylchlorid mit Triethylamin als Base. Im zweiten Schritt wurde die Nitrogruppe des Sulfonamids mithilfe von Zinn(II)-chlorid zum primären Amin reduziert. Im letzten Schritt wurde das Carbonsäureamid aus dem entsprechendem Carbonsäurechlorid durch eine nucleophile Substitution gebildet. Hierbei wurden zwei verschiedene Basen (Kaliumcarbonat und Triethylamin) zur Synthese genutzt.



Schema 23: Synthese der verzweigten Sulfonamide: 1. Nucleophile Substitution, 2. Reduktion der Nitrogruppe, 3. Nucleophile Substitution.

Die beiden ersten Stufen verliefen in der Regel problemlos und mit moderaten bis guten Ausbeuten im ersten Schritt (23-63 %) und nahezu quantitativen Ausbeuten im zweiten Schritt. Einzig die Reduktion zu 4-Amino-*N*-(4-methoxybenzyl)-*N*-phenylbenzensulfonamid gelang lediglich mit einer moderaten Ausbeute von 44 %. Die Verbindung lag hierbei als sehr viskoser, gelblicher Feststoff dünn auf der Kolbenwand verteilt vor, sodass die Identität nur mas-

senspektrometrisch bestimmt wurde. Die Synthese der Verbindungen **Schl-38-072** bis **Schl-38-076** sowie **Schl-38-078** lieferte gute, die der Verbindungen **Schl-38-077**, **Schl-38-079** bis **Schl-38-081** relativ niedrige Ausbeuten, da sich die Reinigung schwierig gestaltete (Abbildung 88).

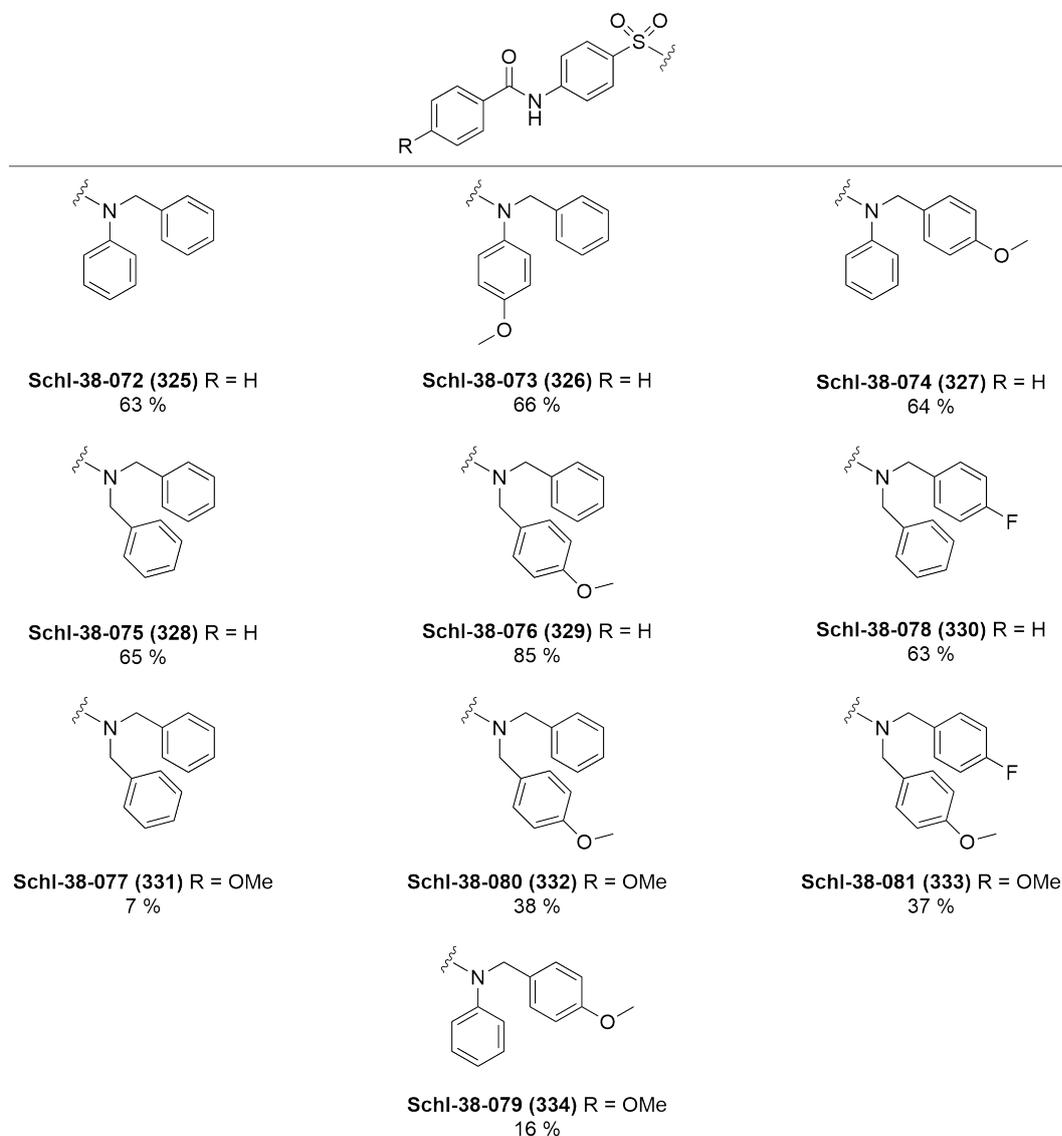


Abbildung 88: Dargestellte verzweigte Sulfonamide und ihre Ausbeuten.

Wie schon im Falle der propellerartigen Sulfonamide sollten die Molekülteile B und C durch die Einführung verschiedener EWGs und EDGs variiert werden. Im Molekülteil B sollte zudem ein *N*-Phenylsulfonamid- und ein *N*-Benzylsulfonamid-Rest verwendet werden. Die Mo-

difikation des Molekülteil A bestand in der Einführung einer Methoxygruppe am Phenylrest. Zuerst wurde hier gezielt an einem Ring entweder eine elektronenschiebende Methoxygruppe zur Adressierung der Subtaschen A und B oder der elektronenziehende Fluor-Substituent zur Adressierung der Subtasche C eingeführt. Anschließend wurden in den Derivaten **Schl-38-079** und **Schl-38-080** beide Molekülteile A und B durch die Verwendung einer Methoxygruppe modifiziert. Zuletzt wurde mit Verbindung **Schl-38-081** der Versuch einer Optimierung aller drei Ringe hinsichtlich ihrer elektronischen Eigenschaften unternommen.

3.11.3 Biologische Ergebnisse der verzweigten Sulfonamide

Die biologische Testung begann mit einem WST-1-Assay zur Untersuchung der Zytotoxizität bei vier verschiedenen Konzentrationen (100 nM, 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M). Anschließend erfolgte der DLA, um die Hemmwirkung der Verbindungen auf die Translation zu beobachten. Die Ergebnisse des DLA sind in Abbildung 89 dargestellt.

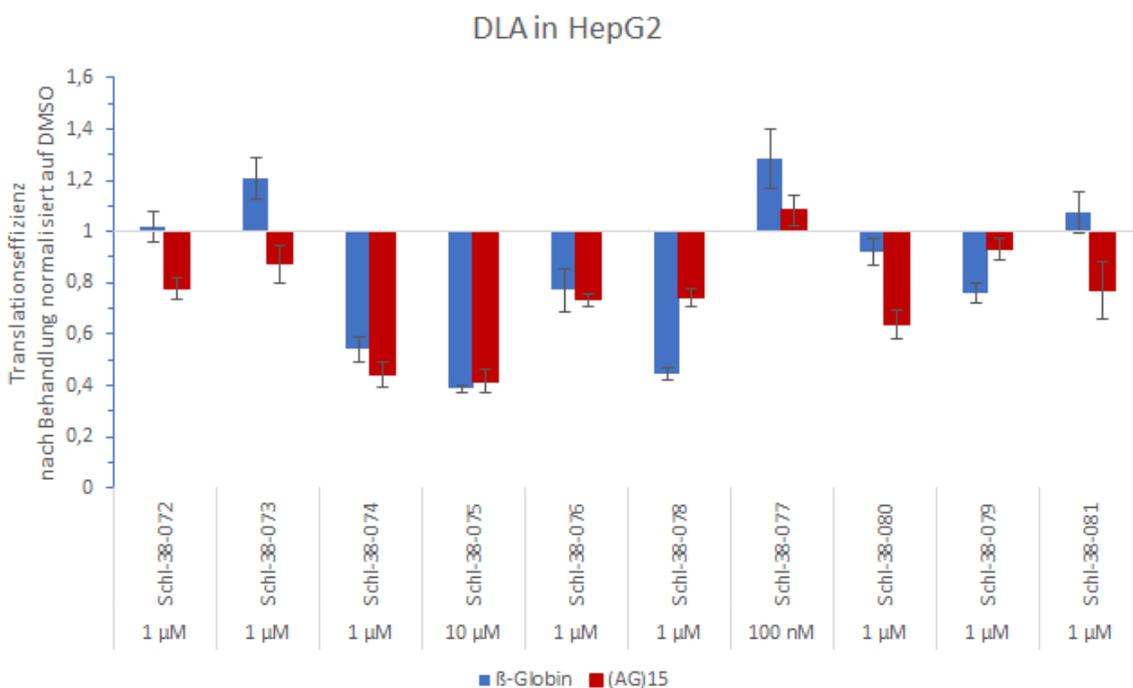


Abbildung 89: Dual-Luciferase-Assay in HepG2-Zellen. Die Translationseffizienz normalisiert auf DMSO ist für verschiedene verzweigte Sulfonamide zusammengefasst.

Drei der zehn verzweigten Sulfonamide wiesen keinen inhibitorischen Effekt auf die Translation auf. Dabei handelte es sich um die Verbindungen **Schl-38-073** (Benzylanilin-Derivat mit R=H), **Schl-38-077** (Dibenzylamin-Rest mit R=OMe) und **Schl-38-079** (4-Methoxybenzylanilin-Rest mit R=OMe). Ein starker unspezifischer Effekt konnte bei **Schl-38-074** (4-Methoxybenzylanilin-Rest mit R=H) und **Schl-38-075** (Dibenzylamin-Rest mit R=H) beobachtet werden. Die Verbindungen **Schl-38-076** (*N*-Benzyl-1-(4-methoxybenzylamin)-Rest mit R=H) und **Schl-38-078** (*N*-Benzyl-1-(4-fluorobenzylamin)-Rest mit R=H) wiesen einen schwachen unspezifischen Effekt auf. Werden die Verbindungen **Schl-38-073** und **Schl-38-074** miteinander verglichen, zeigt **Schl-38-074** (Methoxygruppe am Benzylrest) eine starke unspezifische Hemmung der Translation, wohingegen bei **Schl-38-073** (Methoxygruppe am Phenylrest) kein inhibitorischer Effekt zu beobachten war. Die biologischen Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Phenylrest die kleine Subtasche C besetzt, während der Benzylrest die größere Subtasche B einnimmt. In dieser Subtasche ist dann ein Methoxy-Substituent optimal, um die Elektronendichte zu erhöhen. Die vielversprechendsten verzweigten Sulfonamide waren die Verbindungen **Schl-38-072** (Benzylanilin-Rest mit R=H), **Schl-38-080** (*N*-Benzyl-1-(4-methoxybenzylamin)-Rest mit R=OMe) und **Schl-38-081** (*N*-(4-Fluorobenzyl)-1-(4-methoxybenzylamin)-Rest mit R=OMe), bei denen ein spezifischer inhibitorischer Effekt auf die Translation zu beobachten war. Für diese drei Sulfonamide konnte jeweils bei einer Konzentration von 1 μ M eine Hemmung von 22 % für **Schl-38-072**, 23 % für **Schl-38-081** und die stärkste Hemmwirkung mit 36 % für **Schl-38-080** bestimmt werden. Mit Rückblick auf die wirksamsten Verbindungen der Stoffklasse der linearen Sulfonamide konnte die Hemmung der Translation unter Erhalt einer ähnlich starken Wirkung nun um eine Zehnerpotenz verbessert werden (Abbildung 90). Insgesamt weist die Stoffklasse der verzweigten Sulfonamide ein großes Potential auf und bietet noch viel Spielraum für weitere Optimierungen, um die spezifische Hemmwirkung der drei identifizierten Verbindungen zu verbessern. Die aus dieser Dissertation resultierenden vielversprechenden verzweigten Sulfonamide bilden die Grundlage für die weitere Forschung und Entwicklung dieser Stoffklasse. Auf diese Dissertation ist daher nun die Masterarbeit von LISA KEMENA (Arbeitsgruppe SCHLITZER, Philipps-Universität Marburg) gefolgt.

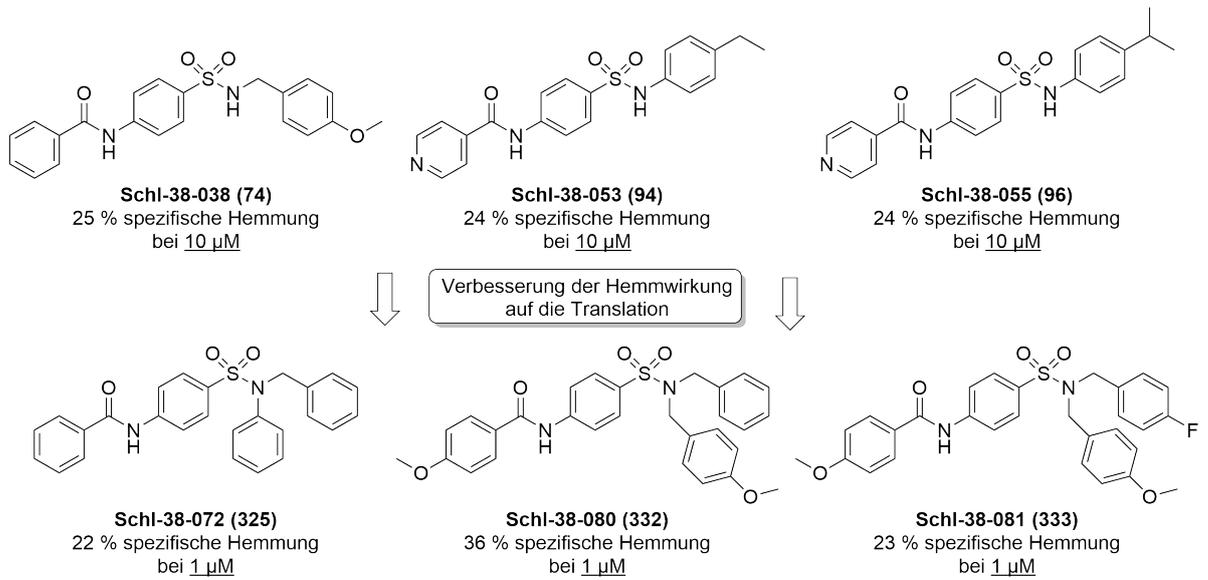


Abbildung 90: Zusammenfassung der Ergebnisse der linearen und verzweigten Sulfonamide. Die Hemmung der Translation konnte unter Erhalt der Wirksamkeit von einer Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ auf $1\ \mu\text{M}$ verbessert werden.

3.12 Biologische Testungen gegen adulte Wurmpaare der Spezies

Schistosoma mansoni

Ausgewählte Verbindungen wurden zu Beginn der Dissertation auf ihre antischistosomale Aktivität gegen adulte Wurmpaare der Spezies *Schistosoma mansoni* untersucht. Die *in vitro* Testung wurde in Kooperation mit dem Arbeitskreis GREVELDING (Institut für Parasitologie, Justus-Liebig-Universität Giessen) durchgeführt.

Die *in vitro* Testung erfolgte bei einer anfänglichen Inhibitorkonzentration von 50 μM . Bei der Beobachtung einer antischistosomalen Aktivität wurde die Konzentration auf 25 μM herabgesetzt. Als Negativkontrolle diente DMSO bei einer Konzentration von 25 μM und als Positivkontrolle Praziquantel bei einer Konzentration von 5 μM . Die adulten Wurmpaare wurden jeweils nach 24 h in einem Gesamtzeitraum von 72 h auf ihre Paarungsstabilität, Motilität, Vitalität und morphologischen Veränderungen hin untersucht. Darüber hinaus wurde die Anzahl der deformierten und nicht-deformierten Eier bestimmt. Es wurden exemplarisch verschiedene lineare Sulfonamide, Rhodanine sowie DIELS-ALDER-Addukte als Vertreter ihrer Substanzklasse zur Testung gegen *Schistosoma mansoni* ausgewählt. In Abbildung 91 sind die Strukturen der sechs getesteten Rhodanine und DIELS-ALDER-Addukte gezeigt.

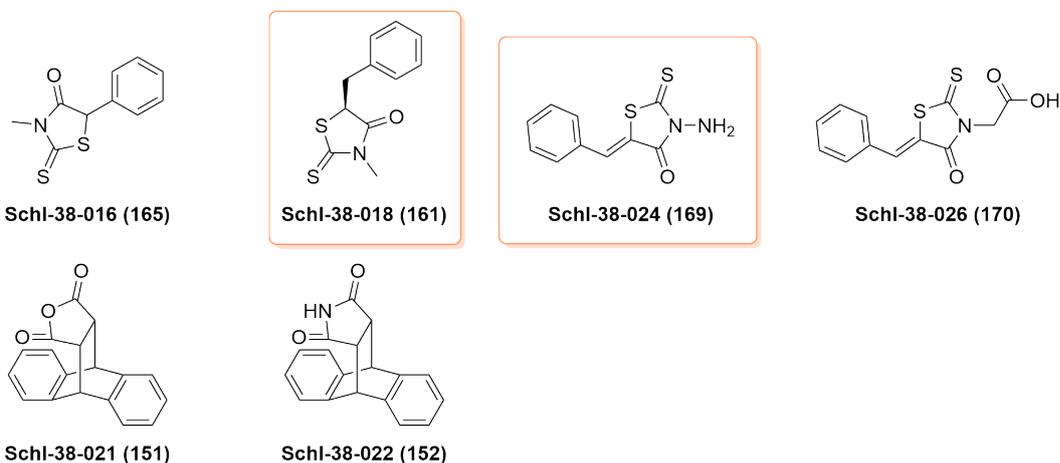


Abbildung 91: Strukturen verschiedener Rhodanine und DIELS-ALDER-Addukte. Die orange Markierung kennzeichnet schwach aktive Verbindungen, die ausschließlich einen Effekt auf die Eiproduktion haben.

In Abbildung 92 ist die Anzahl der Eier normiert auf die DMSO-Kontrolle nach jeweils 24 h für einen Gesamtzeitraum von 72 h für die Rhodanine und die DIELS-ALDER-Addukte bei einer Konzentration von 50 μM zu sehen. Hier wird deutlich, dass die zwei Rhodanine **Schl-38-018** eine komplette Reduktion der Eiproduktion nach 72 h und **Schl-38-024** eine starke Reduktion der Eizahl bewirkten und somit beide Verbindungen als schwach aktiv eingestuft werden können. Das DIELS-ALDER-Addukt **Schl-38-021** wirkte sich eher förderlich auf die Eiproduktion aus. Beim Rhodanin **Schl-38-016** war in den ersten zwei Tagen ebenfalls eine starke Förderung der Eiproduktion zu sehen, nach 72 h jedoch war eine deutliche Reduktion der Eizahl zu beobachten. Da die beiden Rhodanine **Schl-38-018** und **Schl-38-024** neben der Reduktion der Eiproduktion keine weiteren morphologischen Veränderungen verursachten, wurden diese Strukturen für weitere Optimierungen nicht in Betracht gezogen. Insgesamt wiesen die mit den Rhodaninen und DIELS-ALDER-Addukten behandelten Würmer eine normale Motilität auf. Allerdings bewirkten die Substanzen teilweise nur eine geringfügige, teilweise dagegen eine bis zu 90 %ige Entpaarung der adulten Wurmpaare.

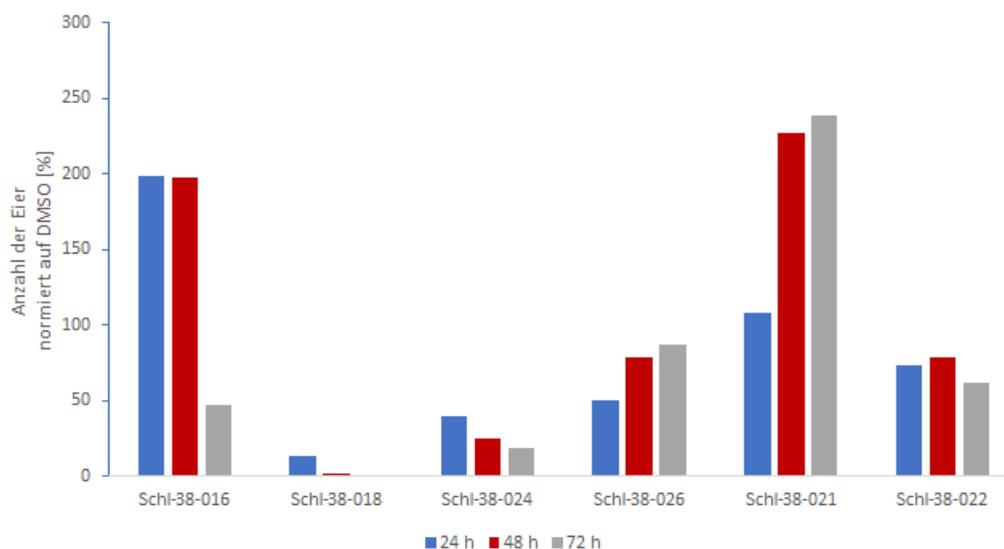


Abbildung 92: Eiproduktion der *S. mansoni* bei einer Inhibitorkonzentration von 50 μM . Die Anzahl der Eier wurde alle 24 h an drei aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt und auf die Zahl der Eier der DMSO-Kontrolle des jeweiligen Tages normiert. Bei den Verbindungen wurde der Test bei $n = 1$ durchgeführt.

In Abbildung 93 sind die linearen Sulfonamide mit verschiedenen funktionellen Gruppen zusammengefasst, die bei einer Konzentration von 50 μM gegen *S. mansoni* getestet wurden.

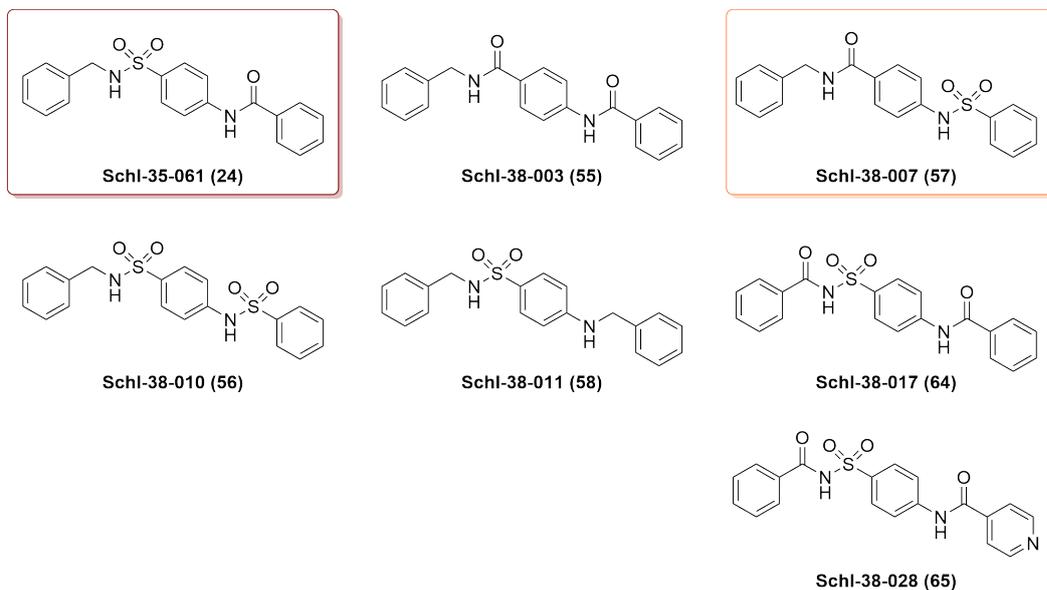


Abbildung 93: Strukturen der linearen Sulfonamide mit verschiedenen funktionellen Gruppen. Die rot markierte Verbindung zeigte einen starken und die orange markierte Verbindung einen schwachen antischistosomalen Effekt.

Bei den Verbindungen **Schl-35-061** und **Schl-38-007**, bei denen die Positionen der Sulfonamid und Carbonsäureamidgruppen vertauscht worden waren, konnte eine starke Reduktion der Eiproduktion beobachtet werden. Eine weniger starke Reduktion um ca. 45 % war bei **Schl-38-003**, der Verbindung, die nur Carbonsäureamide enthält, und bei **Schl-38-011**, der Verbindung mit einem Amin anstatt einer Carbonsäureamidgruppe, zu sehen. Diese Reduktion kann als nicht signifikant eingestuft werden. Folglich sind diese Verbindungen für weitere Optimierungen uninteressant, insbesondere, da sie bei den Würmern keine weiteren Phänotypen hervorriefen (Ausnahme **Schl-38-003**: Tegumentbläschen am Mund eines Männchens). Bei der Behandlung mit **Schl-38-007** konnte ein hyperaktives Wurmpaar sowie eine leichte Darmdilatation bei den Weibchen festgestellt werden. Darüber hinaus gab es keine weiteren Effekte, insbesondere kam es zu keinen Entpaarungen der adulten Wurmpaare. Eine leichte Darmdilatation zeigte sich auch bei sieben Weibchen bei der Behandlung mit **Schl-35-061**. Da **Schl-35-061** zudem eine nahezu vollständige Reduktion der Eiproduktion auf 8 % herbeiführte, bot es sich an, diese Verbindung auch bei einer geringeren Konzentration zu testen. Im Vergleich

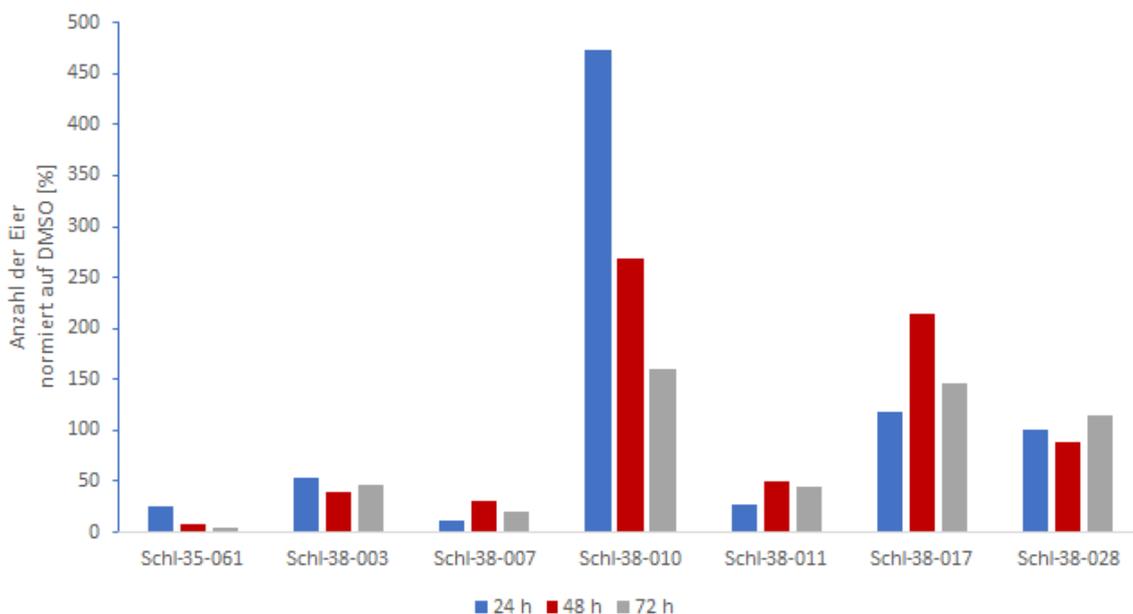


Abbildung 94: Eiproduktion der *S. mansoni* bei einer Inhibitorkonzentration von $50 \mu\text{M}$. Die Anzahl der Eier wurde alle 24 h an drei aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt und auf die Zahl der Eier der DMSO-Kontrolle des jeweiligen Tages normiert. Bei den Verbindungen wurde der Test bei $n = 1$ durchgeführt, mit Ausnahme von **Schl-35-061** mit $n = 2$.

dazu war die Verbindung, bei der die Positionen der Sulfonamid und Carbonsäureamidgruppe vertauscht worden waren und die lediglich eine Reduktion der Eizahl auf 20 % bewirkte, nur schwach antischistosomal aktiv und von geringem Interesse für weitere Optimierungen. Die übrigen drei Verbindungen der Reihe führten zu einer leichten bis starken Förderung der Eiproduktion. Die stärkste Förderung der Eiproduktion mit 160 % bewirkte **Schl-38-010**, eine Verbindung mit zwei Sulfonamiden als funktionelle Gruppen. Die Behandlung mit dieser Verbindung bewirkte darüber hinaus spastische Zuckungen bei einem Wurmpaar, führte aber zu keiner Entpaarung. Die Würmer, die mit den zwei Verbindungen **Schl-38-017** und **Schl-38-028** behandelt wurden, zeigten keine Phänotypen. Hier ist noch anzumerken, dass der elektronärmere Isonicotinoyl-Rest (115 %) anstelle des Benzoylrests (146 %) eine weniger starke Förderung der Eiproduktion auslöste. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden im Folgenden verschiedene lineare Sulfonamide mit überwiegend EWG getestet (Abbildung 95). Zusammenfassend konnte bei allen Verbindungen eine normale Motilität von 3 und unterschiedlich

starke Entpaarungen beobachtet werden (Tabelle 11). Der Wert für die Motilität wurde als Mittelwert aus dem Scoring für die Wurmpaare, Männchen und Weibchen bestimmt. Die Skala des Scorings war von 0 (keine Bewegung) bis 4 (Hyperaktivität) definiert. Dabei wurde die normale Aktivität mit einem Wert von 3, eine reduzierte Aktivität mit 2 und eine minimale Bewegung des Kopfes oder Schwanzes mit 1 gleich gesetzt.

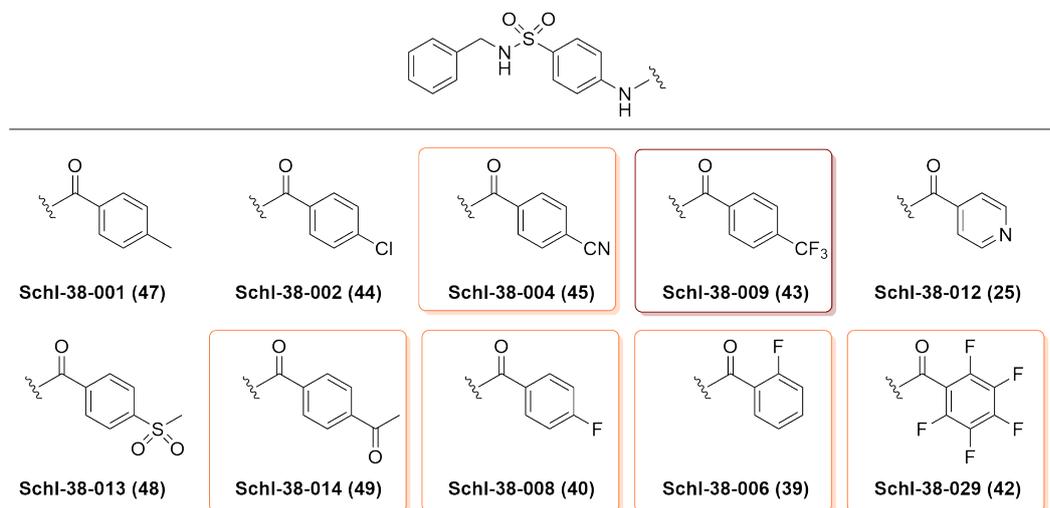


Abbildung 95: Strukturen der linearen Sulfonamide mit Modifikationen des Strukturelements III. Die rot markierte Verbindung zeigte einen starken und die orange markierten Verbindungen einen schwachen antischistosomalen Effekt.

Die Auswirkungen auf die Eiproduktion der linearen Sulfonamide mit den unterschiedlichen Substituenten im Strukturelement III sind in Abbildung 96 gezeigt. Bei den Verbindungen mit dem Methyl-Rest (**Schl-38-001**), dem Chlor-Rest (**Schl-38-002**), dem Methylsulfonyl-Rest (**Schl-38-013**) und dem Pyridyl-Rest (**Schl-38-012**) konnte weder eine signifikante Reduktion der Eiproduktion noch andere Phänotypen beobachtet werden. Ein Problem dieser Stoffklasse war die Löslichkeit, sodass bei der Hälfte der getesteten Sulfonamide teilweise viel Substanz im Well ausfiel. Eine nahezu vollständige Reduktion der Eiproduktion auf 2.5 % verursachte die Verbindung mit dem Trifluormethyl-Rest (**Schl-38-009**) in der ersten Testreihe, sodass im Anschluss in der zweiten Testreihe Verbindungen mit mehr elektronenziehenden Gruppen für die Testung ausgewählt wurden. Diese Beobachtung korreliert mit der bisherigen Beobachtung, dass eine Verbindung mit einem Isonicotinoyl-Rest (**Schl-38-017**) anstelle eines Benzoylrests (**Schl-38-028**) eine stärkere Reduktion der Eiproduktion verursacht. So konnten

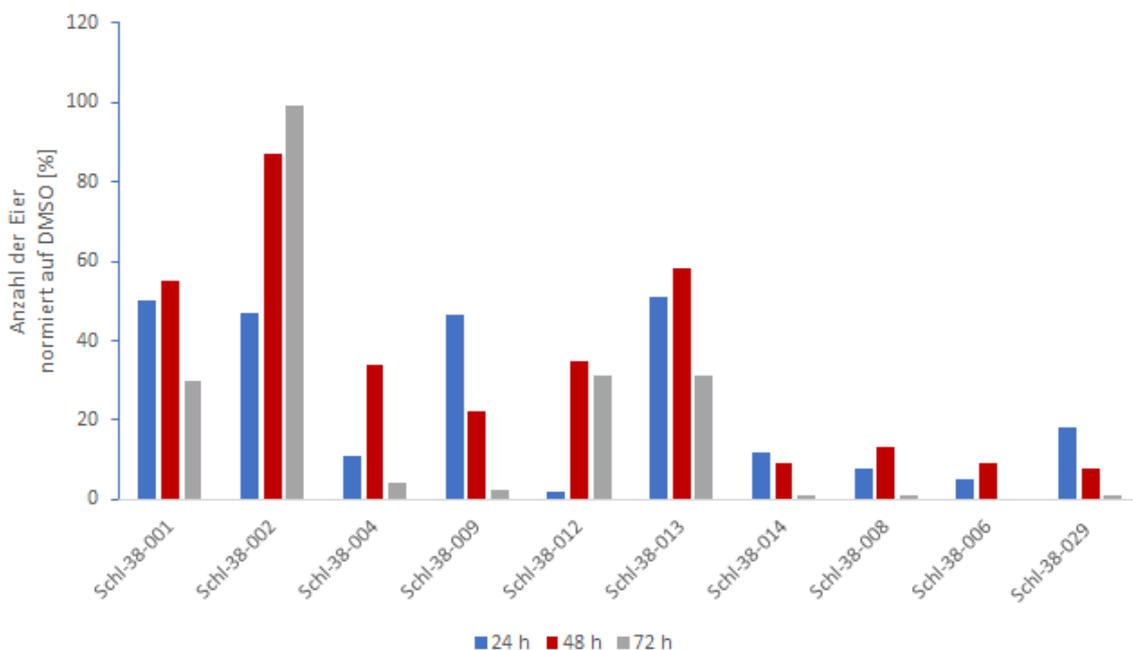


Abbildung 96: Eiproduktion der *S. mansoni* bei einer Inhibitorkonzentration von 50 μM . Die Anzahl der Eier wurde alle 24 h an drei aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt und auf die Zahl der Eier der DMSO-Kontrolle des jeweiligen Tages normiert. Bei den Verbindungen wurde der Test bei $n = 1$ durchgeführt, mit Ausnahme von **Schl-38-009** mit $n = 2$.

weitere Verbindungen mit einem vergleichbar starken Effekt auf die Eiproduktion identifiziert werden. Dabei handelte es sich um **Schl-38-004** mit einem Cyano-Rest, **Schl-38-014** mit einem Methylcarbonyl-Rest und drei weitere Verbindungen mit Fluor-Resten im Strukturelement III (**Schl-38-008**, **Schl-38-006**, **Schl-38-029**). Diese Verbindungen haben somit einen schwachen antischistosomalen Effekt. Bei dem Test der Verbindung **Schl-38-014** waren zudem ein Männchen und drei Weibchen zu beobachten, die sich kaum noch bewegen konnten. Bei den anderen Verbindungen waren keine weiteren Phänotypen zu sehen. Es gab hier aber Probleme mit der Löslichkeit. Die Motilität der Würmer bewegte sich auch bei diesen Derivaten im normalen Bereich und es konnten unterschiedliche Paarungsstabilitäten beobachtet werden (Tabelle 11).

Tabelle 11: Zusammenfassung der Motilität und Paarungsstabilität der getesteten Verbindungen.

Verbindung	Konzentration	Entpaarung nach 72 h	Motilität
Schl-38-016	50 μ M	90 %	3.0
Schl-38-018	50 μ M	100 %	3.0
Schl-38-024	50 μ M	70 %	3.0
Schl-38-026	50 μ M	10 %	3.0
Schl-38-021	50 μ M	0 %	3.0
Schl-38-022	50 μ M	10 %	3.0
Schl-38-003	50 μ M	30 %	3.0
Schl-38-007	50 μ M	0 %	3.0
Schl-38-010	50 μ M	0 %	3.0
Schl-38-011	50 μ M	70 %	3.0
Schl-38-017	50 μ M	10 %	3.0
Schl-38-028	50 μ M	20 %	3.0
Schl-38-001	50 μ M	20 %	3.0
Schl-38-002	50 μ M	10 %	3.0
Schl-38-004	50 μ M	90 %	2.5
Schl-38-012	50 μ M	40 %	3.0
Schl-38-013	50 μ M	50 %	3.0
Schl-38-014	50 μ M	90 %	2.5
Schl-38-008	50 μ M	100 %	2.5
Schl-38-006	50 μ M	80 %	2.5
Schl-38-029	50 μ M	50 %	3.0
Schl-35-061	25 μ M	100 %	2.2
Schl-38-009	25 μ M	100 %	2.4

Nach der ersten Testreihe hatten sich die beiden Verbindungen **Schl-35-061** und **Schl-38-009** mit dem Trifluormethyl-Rest als vielversprechend herauskristallisiert, da sie eine sehr starke Reduktion der Eiproduktion und zudem morphologische Veränderungen in Form von Darmdilataationen herbeiführten. Folglich wurden sie anschließend bei einer Konzentration von 25 μ M getestet (Abbildung 97).

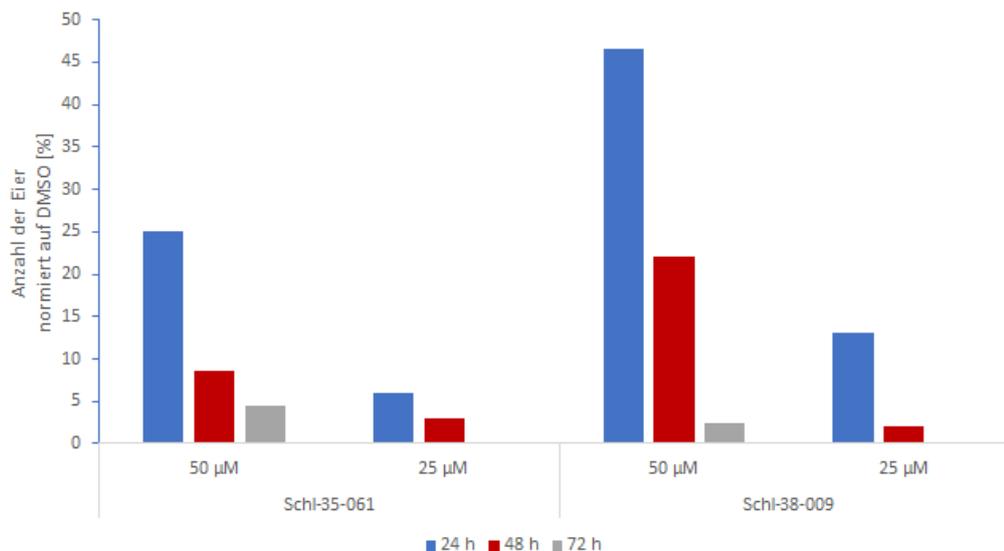


Abbildung 97: Eiproduktion der *S. mansoni* bei einer Inhibitorkonzentration von 25 µM und 50 µM. Die Anzahl der Eier wurde alle 24 h an drei aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt und auf die Zahl der Eier der DMSO-Kontrolle des jeweiligen Tages normiert. Bei einer Konzentration von 50 µM wurde der Test bei n = 2 und bei einer Konzentration von 25 µM bei n = 1 durchgeführt.

Für beide Verbindungen konnte die Reduktion der Eizahl bei der niedrigeren Konzentration von 25 µM beobachtet werden. So betrug die Eiproduktion bei einer Behandlung mit **Schl-35-061** nach 24 h bei einer Konzentration von 50 µM noch 25 %, während sie bei der niedrigeren Konzentration nur noch bei 6 % lag. Dieser Trend konnte auch bei **Schl-38-009** beobachtet werden. Auch war eine vollständige Hemmung der Eiproduktion nur bei einer Konzentration von 25 µM zu sehen. Eine möglicher Ursache hierfür könnte in der verbesserten Löslichkeit bei geringeren Inhibitorkonzentrationen liegen, da in diesem Fall weniger ausgefallene Substanz im Well zu beobachten war. Auch bei den niedrigen Konzentrationen zeigten beide Verbindungen weiterhin morphologische Veränderungen. Darmdilatationen konnten bei allen Weibchen bei Behandlung mit **Schl-38-009** und bei drei Männchen sowie bei vier Weibchen unter Einfluss von **Schl-35-061** festgestellt werden (Abbildung 98).



Abbildung 98: Morphologische Veränderung in Form von Darmdilatationen durch die Behandlung der *S. mansoni* mit zwei Sulfonamiden bei 25 μM nach 72 h.

Abschließend können die beiden Verbindungen **Schl-35-061** und **Schl-38-009** als vielversprechend eingestuft werden. Denn obwohl nur eine kleine Auswahl an Verbindungen aus drei Stoffklassen gegen die *Schistosoma mansoni* Paare getestet wurden, fanden sich bei einer der Stoffklassen gleich zwei Verbindungen, die einen starken antischistosomalen Effekt bei einer Konzentration von 25 μM zeigten. Im Vergleich zu den bisher im Arbeitskreis SCHLITZER synthetisierten Inhibitoren, die eine vergleichbare Hemmwirkung wie das in der Therapie verwendete Praziquantel haben, stellen die im Rahmen dieser Arbeit entdeckten Verbindungen jedoch nur potentielle Ausgangsmoleküle für eine Weiterentwicklung dar.

3.13 Biologische Testung der linearen Sulfonamide gegen das Rift-Valley-Fever-Virus (RVFV)

Ausgewählte lineare Sulfonamide wurden zu Beginn dieser Dissertation auf ihre Hemmwirkung gegen den *Rift-Valley-Fever-Virus* (RVFV) untersucht. Die Testung wurde in Kooperation mit dem Arbeitskreis WEBER (Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Giessen) von PATRICK SCHMERERER durchgeführt.

Die *in vitro*-Testung erfolgte mittels einer qRT-PCR (*quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction*) in humanen Leberkarzinomzellen (HuH-7 Zellen). Bei der qRT-PCR handelt es sich um eine Methode zur Vervielfältigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren. Der allgemeine Ablauf der Testung erfolgte wie im Folgenden beschrieben (Abbildung 99). Nach dem Säen der HuH-7 Zellen wurde der potentielle Inhibitor zugegeben. Nach 1 h erfolgte die Infektion der Zellen mit dem *Rift-Valley-Fever-Virus* MP12 mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 0.1. Die Probennahme wurde 18 h nach der Infektion vorgenommen. Der Inhibitor wurde für die Dauer des Experiments auf den Zellen belassen.

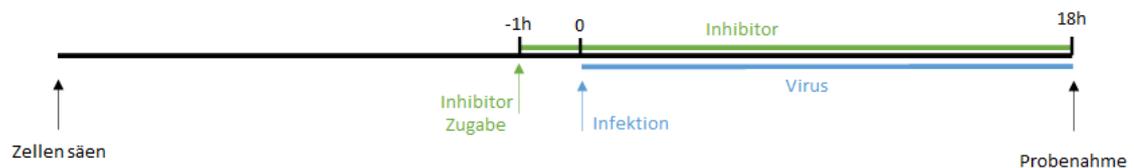


Abbildung 99: Schematische Darstellung des Ablaufs zur Testung gegen RVFV. Übernommen von P. SCHMERERER.

Bei der Probennahme wurden zum einen RNA-Proben für eine qRT-PCR, zum anderen der Überstand für eine Virustitration entnommen. Für ein erstes Screening der Substanzen wurden RNA-Proben entnommen, da diese Vorgehensweise weniger aufwendig ist. Bei der Virustitration wurde aus dem Überstand eine Verdünnungsreihe erstellt und anschließend mittels Mikroskopie die Anzahl der toten Zellen bestimmt. Bei dem ersten Screening der 13 linearen Sulfonamide wurde bei der Probennahme ein qRT-PCR mit $n=1$ durchgeführt (Abbildung 100). Die potentiellen Inhibitoren wurden bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ getestet. In der Graphik ist der relative Prozentsatz der Infektion aufgetragen, d.h. die maximale Menge

der viralen RNA. Als Kontrolle diente DMSO. Dabei zeigten zwei Verbindungen, **Schl-38-006** und **Schl-38-012**, die stärkste Hemmwirkung mit 58 % und 62 %. Alle anderen Sulfonamide hatten keinen signifikanten Effekt (Abbildung 101a).

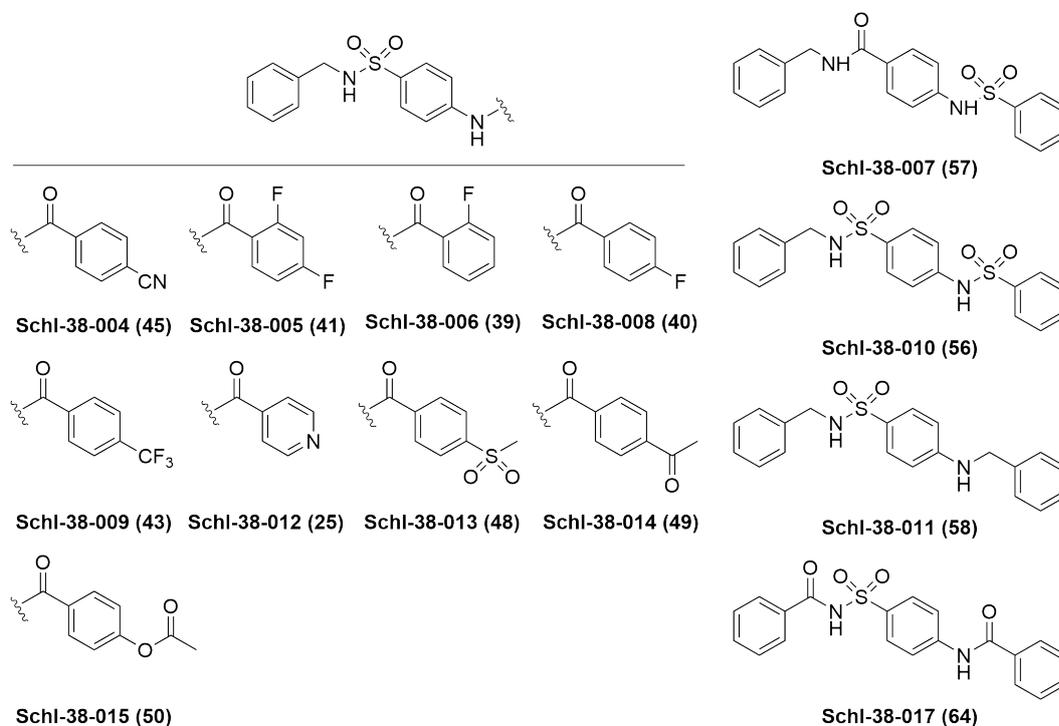
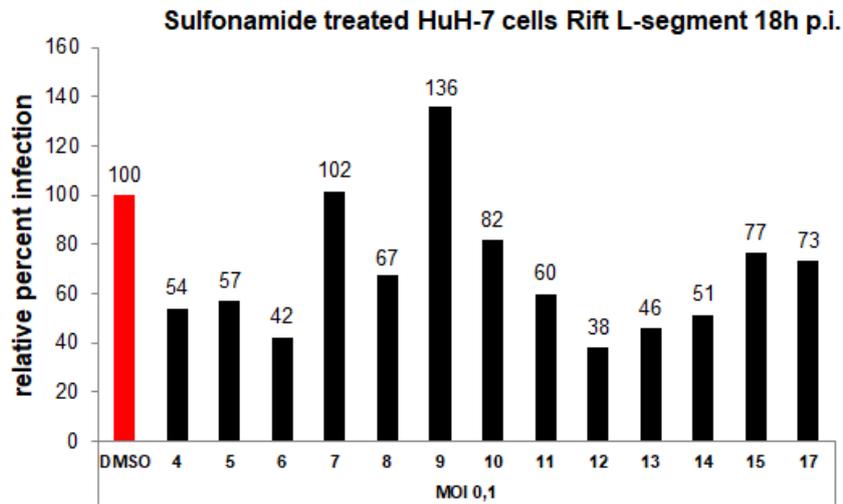


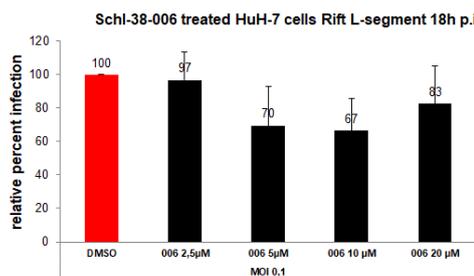
Abbildung 100: Strukturen der 13 linearen Sulfonamide, die gegen den RVFV getestet wurden.

Folglich wurden die beiden wirksamen Verbindungen bei verschiedenen Konzentrationen (2.5 μM , 5 μM , 10 μM und 20 μM) mit $n=3$ getestet (Abbildung 101b und 101c). Bei **Schl-38-006** war die Hemmung bei einer Konzentration von 10 μM mit 33 % am niedrigsten, lag bei Konzentrationen von 20 μM und 5 μM aber höher, was eine eindeutige Aussage zur Hemmung der Produktion viraler RNA schwierig macht. Bei einer Konzentration von 2.5 μM war keine Hemmwirkung mehr zu sehen. Während die Testung von **Schl-38-006** schwankende Ergebnisse lieferte, konnte für **Schl-38-012** eine ca. 50 % ige Hemmung der Produktion viraler RNA bei Konzentrationen von 5 μM und 10 μM beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 20 μM betrug die Hemmung sogar 64 % und noch 60 % bei einer Konzentration von 2.5 μM . Resultierend aus diesen Ergebnissen, wurde eine Virustitration bei **Schl-38-012** bei 20 μM mit $n=3$ durchgeführt (Abbildung 101d). Diese Verbindung erreichte eine Hemmung

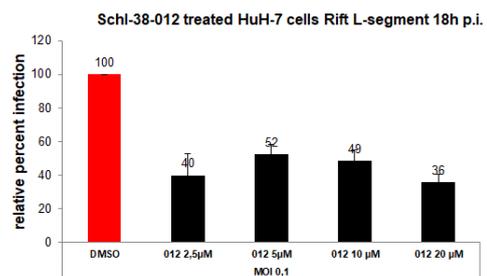
der Produktion der Virus-Partikel im Bereich einer halben Log-Stufe, was ein Indiz für den richtigen Trend ist. Eine effektive Hemmung sollte im Bereich einer Log-Stufe betragen.



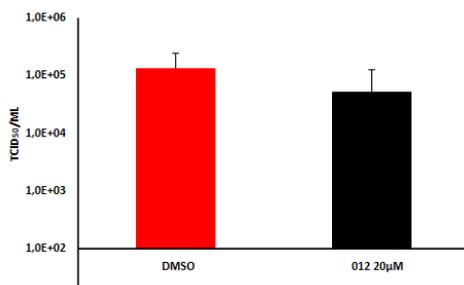
(a) Biologische Ergebnisse zur Testung gegen RVFV aller 13 linearen Sulfonamide bei 10 μ M.



(b) Schl-38-006.



(c) Schl-38-012.



(d) Virustitration von Schl-38-012 bei 20 μ M.

Abbildung 101: Biologische Ergebnisse aus den Testungen gegen RVFV: **Schl-38-006** zeigt eine Hemmung der viralen RNA im Bereich von 17-33 % bei 5-20 μ M. Bei **Schl-38-012** ist eine Hemmung von ca. 50 % bei 5-10 μ M und eine Verringerung des Virustiters um eine halbe Log-Stufe bei 20 μ M zu beobachten. Übernommen von P. SCHMERER.

3.14 Biologische Testungen gegen Coronaviren

Die Untersuchung, ob Verbindungen einen antiviralen Effekt besitzen, wurde in der Arbeitsgruppe ZIEBUHR (Fachbereich Medizin, Justus-Liebig-Universität Giessen) von Dr. CHRISTIN MÜLLER durchgeführt.

Zeigten Verbindungen beim *Dual-Luciferase-Assay* in der Arbeitsgruppe GRÜNWELLER einen signifikanten selektiven Effekt auf die Translationseffizienz, konnten sie in der Arbeitsgruppe ZIEBUHR auf ihre antivirale Wirkung untersucht werden. Dabei wurden die Verbindungen auf die Replikation von Coronaviren getestet. Zu Beginn der Dissertation handelte es sich um das humane Coronavirus HCoV-229E, gegen Ende um das für die aktuelle Pandemie verantwortliche Coronavirus SARS-CoV-2. Insgesamt wurden acht Verbindungen auf ihren antiviralen Effekt gegen den humanen Coronavirus (HCoV-229E) bei unterschiedlichen Konzentrationen in MRC5 Zellen getestet. Hierbei wurde der Virustiter des Coronavirus nach 24 h bestimmt. Die Strukturen der getesteten Verbindungen sind in Abbildung 102 zu sehen.

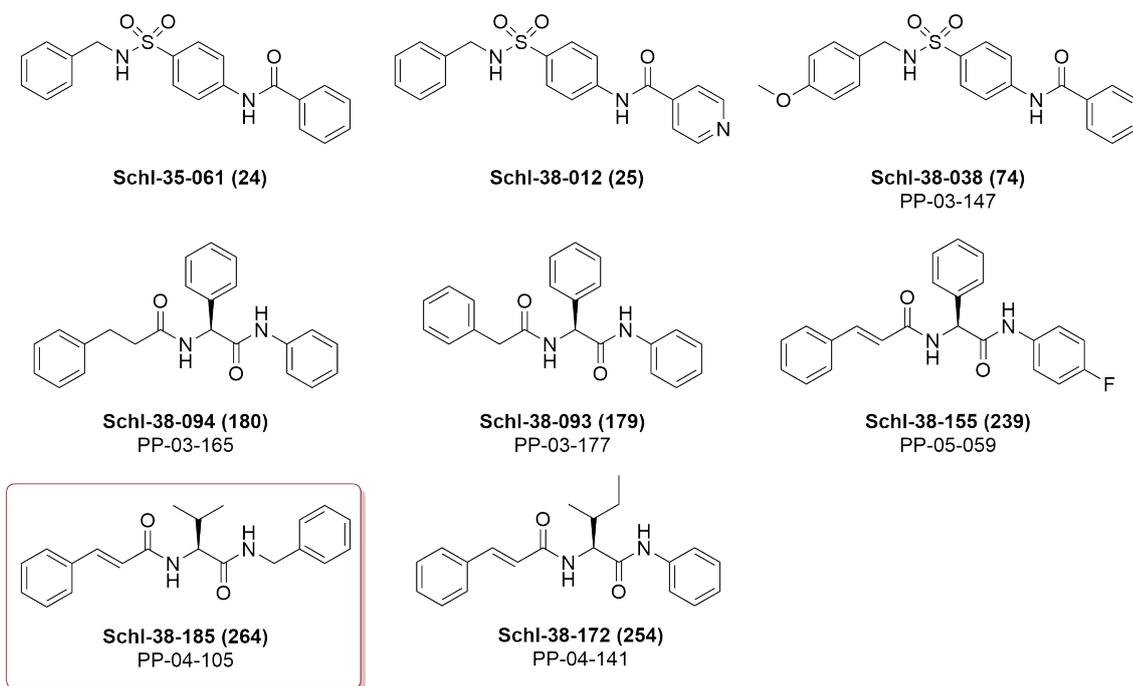


Abbildung 102: Strukturen der linearen Sulfonamide und *N*-Acylaminosäureamide zur Testung gegen das Coronavirus HCoV-229E. Die rot markierte Verbindung zeigte einen antiviralen Effekt.

Die Ausgangsstruktur, **Schl-35-061**, auf der die Serie der linearen Sulfonamide beruht, zeigte bei Konzentrationen von 0.1 nM bis 10 μM keinen antiviralen Effekt (Abbildung 103a). Auch bei **Schl-38-012**, das im DLA eine signifikante Hemmwirkung gezeigt hatte, war kein antiviraler Effekt zu beobachten (Abbildung 103b).

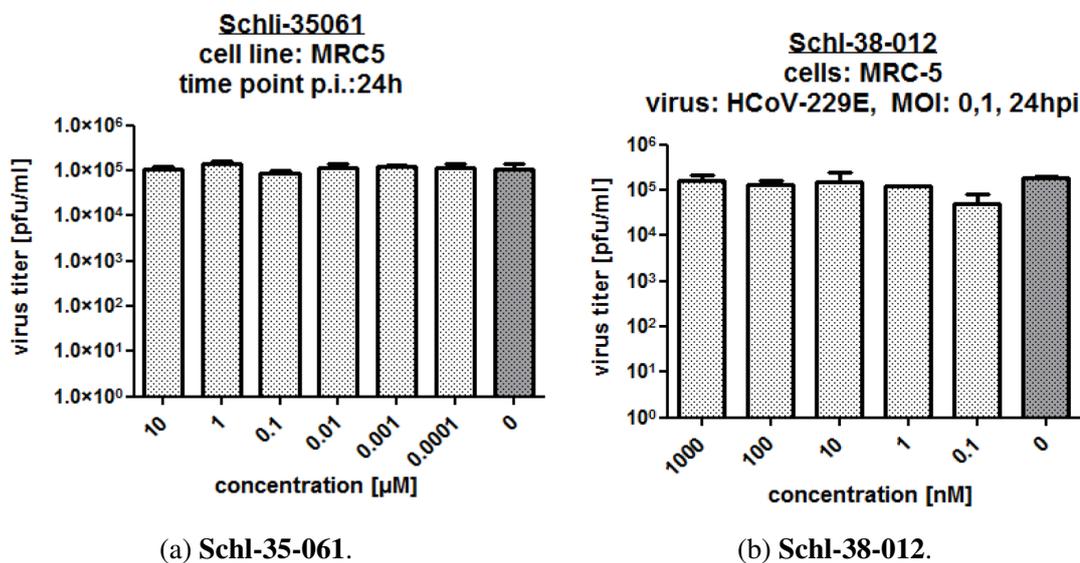


Abbildung 103: Virustitration zweier linearer Sulfonamide bei unterschiedlichen Konzentrationen von 0.1 nm bis 10 μM , in MRC5-Zellen getestet. Beide Verbindungen zeigen keinen antiviralen Effekt.

Im Laufe der Arbeit wurden ein weiteres lineares Sulfonamid und fünf *N*-Acylaminosäureamide auf ihre antivirale Wirkung hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 104 dargestellt. Das lineare Sulfonamid **Schl-38-038** (Abbildung 102) zeigte keinen antiviralen Effekt. Unter den *N*-Acylaminosäureamiden konnte eine Verbindung (**Schl-38-185**, Abbildung 102) identifiziert werden, die eine Reduktion des Virustiters (HCoV-229E) um eine halbe Log-Stufe verursachte. Diese Verbindung stellt einen vielversprechenden Ausgangspunkt für weitere Optimierungen der Struktur dar. So wurden die in Kapitel 3.9.2 beschriebenen Modifikationen am Valin-Derivat **Schl-38-185** vorgenommen.

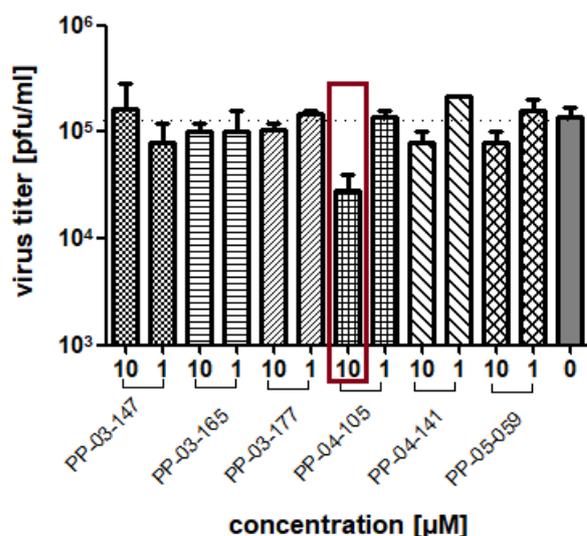


Abbildung 104: Virustitration verschiedener Verbindungen bei 1 μM und 10 μM . Bei **Schl-38-185** (PP-04-105) ist ein antiviraler Effekt zu sehen.

Im Folgenden wurden drei weitere Verbindungen auf ihren antiviralen Effekt gegen den Coronavirus SARS-CoV-2 getestet. Ihre Strukturen sind in Abbildung 105 zu sehen. Bei den Verbindungen handelte es sich um zwei lineare Sulfonamide und ein *N*-Acylaminosäureamid, welche einen selektiven inhibitorischen Effekt auf die Translationseffizienz im DLA gezeigt hatten.

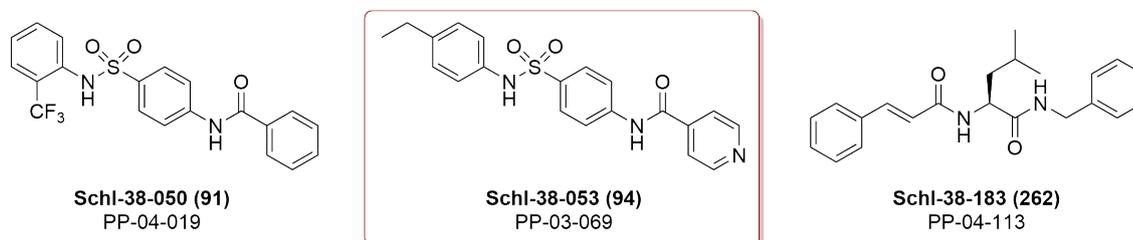


Abbildung 105: Strukturen der linearen Sulfonamide und *N*-Acylaminosäureamide zur Testung gegen den Coronavirus SARS-CoV-2. Die rot markierte Verbindung zeigte einen antiviralen Effekt.

Die drei Verbindungen wurden bei unterschiedlichen Konzentrationen (1 μM , 5 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM) gegen SARS-CoV-2 in Vero E6 Zellen getestet. Bei den Verbindungen **Schl-38-050** und **Schl-38-183** war kein antiviraler Effekt zu beobachten (Abbildung 106a, 106b).

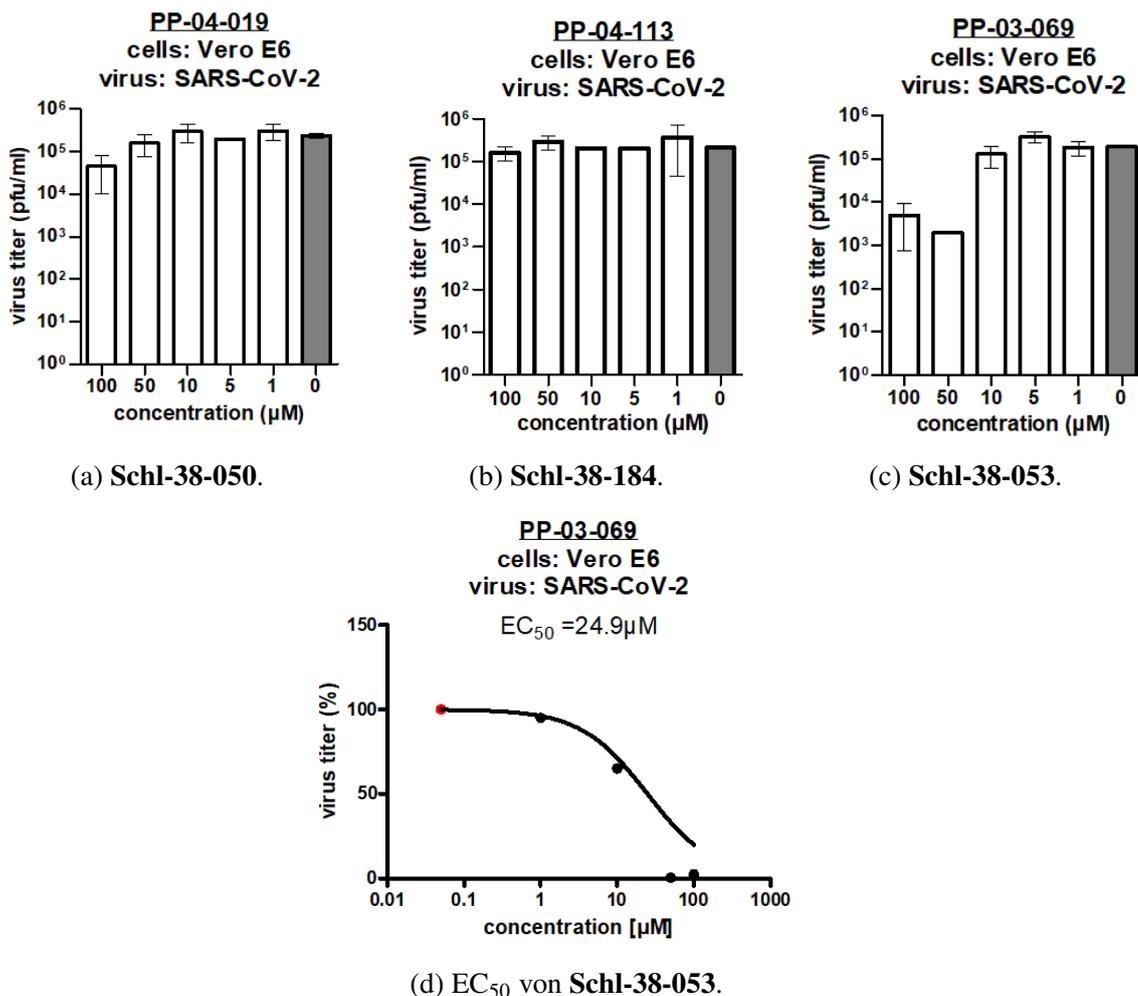


Abbildung 106: Virustitration der drei Verbindungen **Schl-38-050**, **Schl-38-053** und **Schl-38-183** gegen SARS-CoV-2 in Vero E6 Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen.

Bei **Schl-38-053** hingegen konnte eine deutliche Reduktion des Virustiters bei Konzentrationen von $100 \mu\text{M}$ und $50 \mu\text{M}$ beobachtet werden. Die Reduktion betrug mehr als eine ganze Log-Stufe und kann somit als signifikant eingestuft werden. Daraus resultierend wurde der EC_{50} für **Schl-38-053** mit einem Wert von $24.9 \mu\text{M}$ bestimmt. Dieser antivirale Effekt im mikromolaren Bereich zählt zu den vielversprechendsten Ergebnissen dieser Dissertation und rückt die Sulfonamide wieder ins Licht zukünftiger Forschung. Ausgehend von dieser Verbindung können in weiteren Arbeiten verschiedene Modifikationen mittels molekularem Docking untersucht werden. Darüber hinaus könnten weitere biologische Testungen wie der TSA er-

folgen, um eine potentielle eIF4A-spezifische Bindung nachzuweisen. Bei der Verbindung **Schl-38-053** handelt es sich somit um die einzige Verbindung dieser Dissertation, die einen antiviralen Effekt gegen den Coronavirus SARS-CoV-2 aufwies. In Kombination mit den Erkenntnissen aus dem DLA und TSA könnten in weiteren Arbeiten gezielte Optimierungen zur Verbesserung des antiviralen Effekts vorgenommen werden.

3.15 Biologische Testungen mittels Thermal-Shift-Assay (TSA)

Für einige Verbindungen wurde im Laufe der Arbeit der *Thermal-Shift-Assay* (TSA) genutzt, um so mit einem geringen Aufwand größere Mengen an Verbindungen zu untersuchen. Mit dem TSA kann die Proteinstabilität bei Behandlung mit einem potentiellen Inhibitor untersucht werden. Bindet der potentielle Inhibitor mit hoher Affinität an das Protein, erhöht dies dessen Thermostabilität und die Denaturierung des Proteins setzt bei einer höheren Temperatur ein. So beträgt die Temperaturerhöhung bei dem nanomolaren Inhibitor Silvestrol ca. 8 °C bei einer Konzentration von 100 µM. Die Aussagekraft der Testung bei einer einzigen Konzentration wird zurzeit noch im Arbeitskreis GRÜNWELLER untersucht. Das Ergebnis des TSA bietet jedoch nur einen ersten Hinweis auf die eIF4A-Spezifität und erst nach Testung mittels eines DLA kann eine genaue Aussage über die Hemmwirkung getroffen werden. Es wurde im Arbeitskreis GRÜNWELLER festgestellt, dass eine Temperaturverschiebung im TSA nicht zwangsläufig mit einem eIF4A-spezifischen Effekt einhergeht, wenn die Ergebnisse der unterschiedlichen Testungen betrachtet werden. Folglich eignet sich der TSA nur für ein erstes Screening größerer Mengen an Verbindungen oder liefert als zusätzliches Experiment umfangreichere Daten im Falle vielversprechender Verbindungen.

In Abbildung 107 sind alle Strukturen mit einer signifikanten Temperaturverschiebung von ≥ 1 °C zusammengefasst. Hierbei weisen die unterschiedlichen Farben auf deren Ergebnis im DLA hin. So bedeutet eine grüne Färbung eine spezifische Hemmwirkung im DLA, eine rote Färbung keine oder eine unspezifische Hemmung hin. Einer orange Färbung bedeutet, dass der DLA aufgrund einer hohen Zytotoxizität im WST-1-Assay nicht durchgeführt wurde. Auffällig ist, dass im TSA die beiden Indol-Derivate (**Schl-38-102** und **Schl-38-103**) sowie die verzweigten Sulfonamide (**Schl-38-075**, **Schl-38-073**, **Schl-38-072**) mitunter eine signifikante Temperaturerhöhung verursachten. Im DLA konnte bei den Indol-Derivaten und den beiden verzweigten Sulfonamiden keine spezifische Hemmung der Translation nachgewiesen werden. Einzig das verzweigte Sulfonamid **Schl-38-072** bewirkte eine spezifische Hemmung, mit einer Temperaturerhöhung von 1.26 °C im TSA. Die größte Verschiebung erreichten zwei lineare Sulfonamide mit je einer Methoxygruppe im Molekülteil A bzw. C mit Werten von 2.87 °C für **Schl-38-038** und 1.78 °C für **Schl-38-019**. Aus der Abbildung 107 geht auch klar hervor,

dass eine positive Temperaturverschiebung nicht mit einer Aktivität im DLA einhergeht, wie es bei den Verbindungen **Schl-38-055** und **Schl-38-156** der Fall ist.

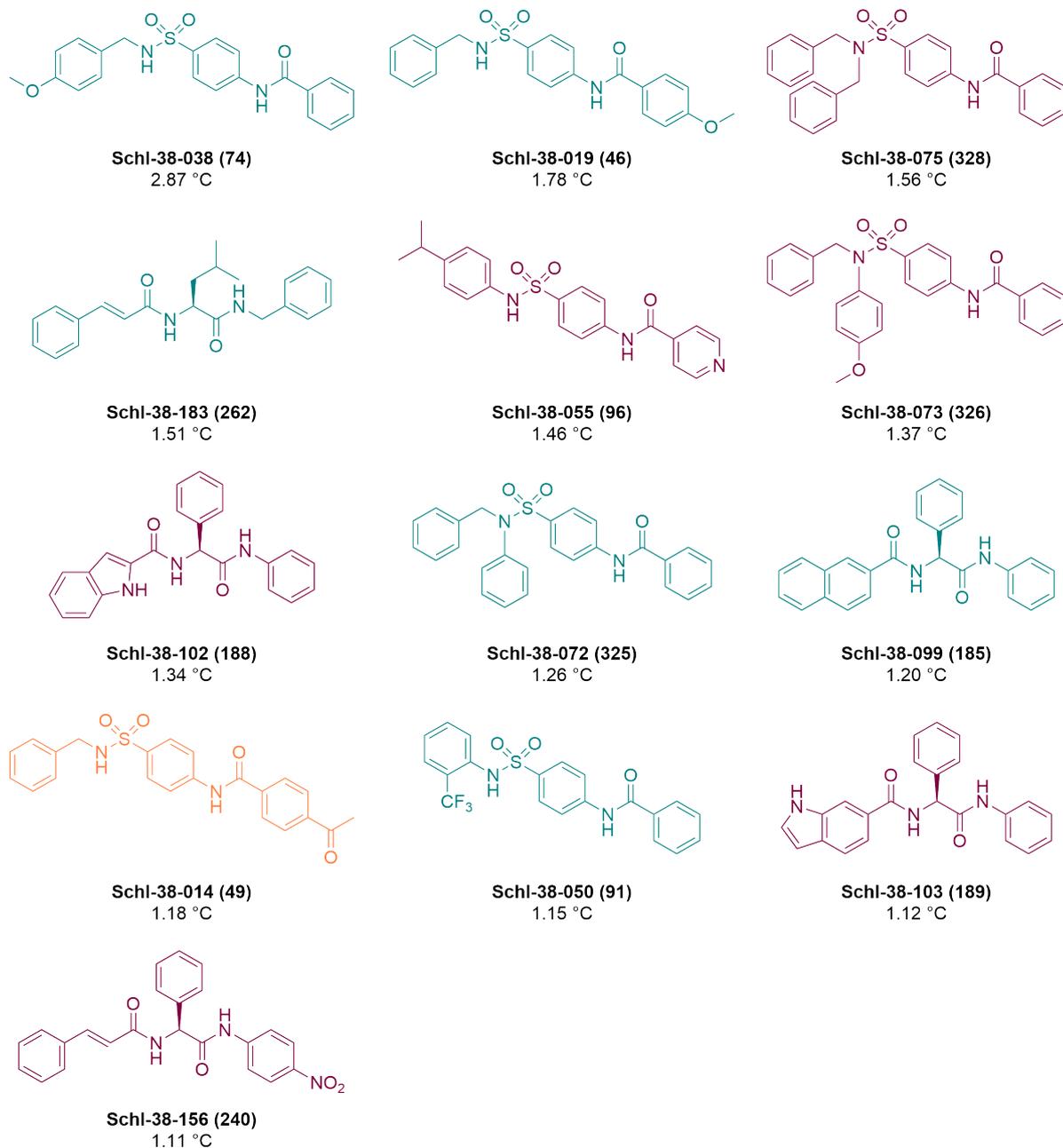


Abbildung 107: Zusammenfassung der Ergebnisse des TSA der aktiven Verbindung mit einer signifikanten Temperaturverschiebung. Die Farben zeigen die Aktivität im DLA an: spezifische Hemmwirkung (grün), keine oder unspezifische Hemmwirkung (rot), zytotoxisch im WST (orange).

Abbildung 108 zeigt alle Verbindungen mit einer negativen Temperaturverschiebung. Die in Abbildung 108 blau dargestellten Strukturen wurden im DLA nicht getestet, da sie im WST-1-Assay nicht zytotoxisch waren und daher von vornherein keine Hemmung erwartet wurde. Die rot gekennzeichneten Strukturen zeigten im DLA keinen spezifischen inhibitorischen Effekt auf die Translation und die grün gekennzeichneten Strukturen waren im DLA aktiv.

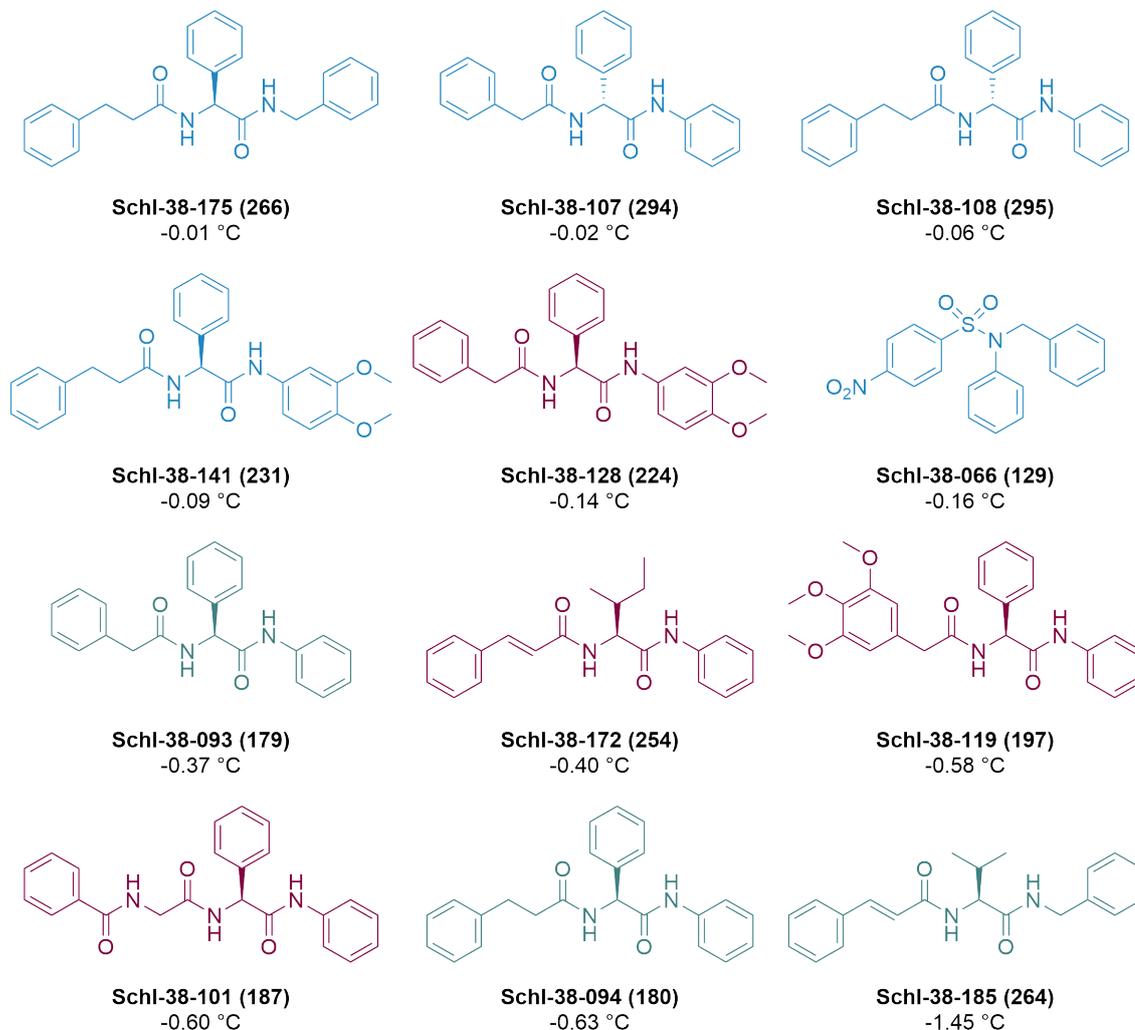


Abbildung 108: Zusammenfassung der Ergebnisse des TSA der inaktiven Verbindung mit einem signifikanten Temperaturverschiebung. Die Farben zeigen die Aktivität im DLA an: spezifische Hemmwirkung (grün), keine oder unspezifische Hemmwirkung (rot), nicht getestet wegen fehlender Zytotoxizität im WST (blau).

In dieser Übersicht sind vor allem die Verbindungen mit einer Aktivität im DLA interessant, so die sehr vielversprechenden Verbindungen **Schl-38-093** und **Schl-38-094** mit einem eIF4A-

spezifischen Effekt. Hier konnte im TSA keine Stabilisierung der Proteinbindung ermittelt werden. Auch die entsprechenden D-Enantiomere (**Schl-38-107** und **Schl-38-108**) führten zu einer negativen Verschiebung der Schmelztemperatur. Die Behandlung mit **Schl-38-185**, das einen antiviralen Effekt gegen Coronaviren aufwies, zeigte ebenfalls keine Stabilisierung des Proteins. Bei den übrigen Verbindungen, die zu einer negativen Temperaturverschiebung führten, handelte es sich, abgesehen von einem propellerartigen Sulfonamid **Schl-38-066**, überwiegend um Phenylglycin-Derivate mit verschiedenen Modifikationen. In Anbetracht der verschiedenen biologischen Testungen im Laufe der Dissertation sind in Abbildung 109 alle Ergebnisse der vielversprechendsten Verbindungen zusammengefasst, um ihre Wirkungen auf einen Blick ablesen zu können.

Bei den zwei Grundstrukturen der *N*-Acylaminosäureamide, **Schl-38-093** und **Schl-38-094**, konnte lediglich im DLA eine starke eIF4A-spezifische Hemmwirkung auf die Translation nachgewiesen werden. Im TSA und bei der Testung auf einen antiviralen Effekt zeigten beide Verbindungen jedoch nicht den gewünschten Effekt. Ähnlich verhält es sich mit dem Zimtsäure-Derivat **Schl-38-155**, das einen Fluor-Substituenten im Molekülteil B trägt. Hier konnte im TSA nur eine nicht signifikante Temperaturverschiebung 0.26 °C bestimmt und kein antiviraler Effekt beobachtet werden. Bei dem Isoleucin-Derivat **Schl-38-183** und den linearen Sulfonamide **Schl-38-038** und **Schl-38-050** waren sowohl im DLA als auch im TSA eine Aktivität festzustellen. In der Testung gegen Coronaviren konnte jedoch kein antiviraler Effekt beobachtet werden. Das Valin-Derivat **Schl-38-185** muss hier separat betrachtet werden. Denn in diesem Fall konnte sowohl ein spezifischer inhibitorischer Effekt auf die Translation im DLA als auch ein antiviraler Effekt gegen Coronaviren beobachtet werden. Im TSA dagegen konnte keine Verschiebung der Schmelztemperatur gemessen werden. Danach stellt sich die Frage, ob das Valin-Derivat tatsächlich an die Helikase bindet und diese hemmt, oder ob der antivirale Effekt durch die Hemmung eines anderen Proteins im eIF4F-Komplex bewirkt wird. Dies müsste in weiteren Arbeiten durch biologische Testung untersucht werden. Das lineare Sulfoamid **Schl-38-053** zeigte sowohl im DLA als auch in der Testung auf einen antiviralen Effekt Aktivität. Vielmehr konnte sogar ein EC₅₀-Wert von 24.9 μM für diese Verbindung bestimmt werden. Im TSA wurde jedoch nur eine grenzwertige Temperaturverschiebung von

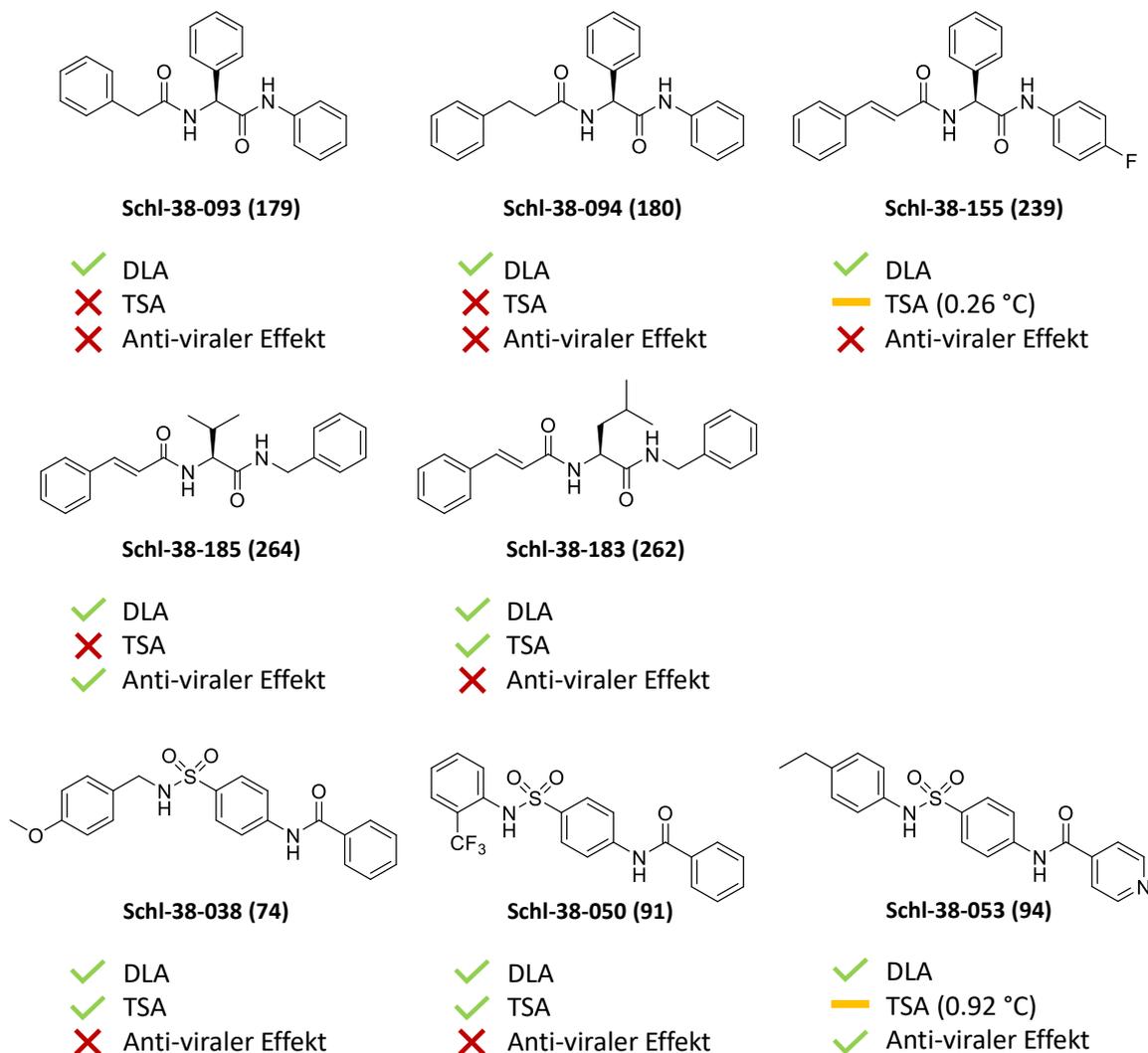


Abbildung 109: Zusammenfassung aller biologischen Ergebnisse der vielversprechendsten Verbindungen. Die Farben zeigen die Aktivität im biologischen Test an: Aktivität (grün), keine Aktivität (rot), nicht signifikante Temperaturverschiebung (orange).

0.92 °C gemessen werden. Die Aussagekraft des TSA ist schwer zu deuten, da es Fälle gibt, in denen ein antiviraler Effekt vorliegt, im TSA aber keine Temperaturverschiebung zu beobachten ist. Auch der umgekehrte Fall war bei einigen Verbindungen zu sehen. Verbindungen mit einem positivem Ergebnis im DLA zeigten auch nicht unbedingt einen antiviralen Effekt. Aber ohne ein positives Ergebnis im DLA können die Verbindungen auch keinen antiviralen Effekt erzielen.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von Hemmstoffen für die DEAD-Box Helikase eIF4A, die für die antivirale Wirkstoffentwicklung eine vielversprechende Zielstruktur darstellt. Denn viele RNA-Viren sind bei der Produktion neuer Virionen auf die Wirtshelikase eIF4A angewiesen. Im Rahmen dieser Promotion wurden insgesamt 214 Verbindungen aus sieben verschiedenen Substanzklassen synthetisiert und hinsichtlich ihrer Hemmung der Helikase eIF4A evaluiert. Die Durchführung der dazugehörigen biologischen Testungen erfolgte durch die Arbeitsgruppe GRÜNWELLER. Ausgewählte Verbindungen wurden in der Arbeitsgruppe WEBER auf ihren antiviralen Effekt gegen *Rift-Valley-Fever-Virus* und in der Arbeitsgruppe ZIEBUHR gegen Coronaviren (HCoV-229E, SARS-CoV-2) getestet. Die *in vitro* Testungen gegen *Schistosoma mansoni* wurden eigenständig in Kooperation mit der Arbeitsgruppe GREVELDING durchgeführt.

Das Design der potentiellen eIF4A-Inhibitoren erfolgte sowohl über einen Liganden- als auch einen Struktur-basierten Ansatz. Grundlage für das Liganden-basierten Design war die Struktur von Silvestrol. Die neuartigen Strukturen sollten ähnliche geometrische und elektronische Eigenschaften aufweisen. So wurde die Stoffklasse der linearen Sulfonamide basierend auf den aus der Masterarbeit von P. MENZEL gewonnenen Ergebnissen weitreichend untersucht. Als Grundstruktur für die Weiterentwicklung diente das lineare Sulfonamid **Schl-35-061**, das einen unspezifischen Hemmeffekt auf die Translationseffizienz von PIM1 von 50 % bei einer Konzentration von 5 μ M hatte. Es wurden verschiedene Modifikationen durchgeführt, die in Abbildung 110 zusammen mit ihren Auswirkungen auf die Translation gezeigt sind. Zum einen wurden die funktionellen Gruppen modifiziert (Abbildung 110, gelb). Zum anderen wurde der Abstand zwischen dem Arylrest und dem Sulfonamid-Stickstoff im Strukturelement I (Abbildung 110, rot) durch die Verwendung eines Phenylrests anstelle eines Benzylrests variiert. Darüber hinaus wurden die elektronischen Eigenschaften der Strukturelemente I und III (Abbildung 110, (I) blau und (III) grün) durch die Einführung verschiedener elektronenziehender und -schiebender Gruppen modifiziert. Ein wichtiges Erkenntnis war, dass die Positionierung der Sulfonamid- und Carbonsäureamidgruppe der Grundstruktur beibehalten werden

muss, um die unspezifische Hemmwirkung aufrecht zu erhalten. Werden die Positionen der beiden funktionellen Gruppen vertauscht oder eine andere funktionelle Gruppe wie ein Amin oder eine Sulfonamidgruppe anstelle der Carbonsäureamidgruppe eingesetzt, geht dies mit einem kompletten Verlust der Hemmung der Translation einher.

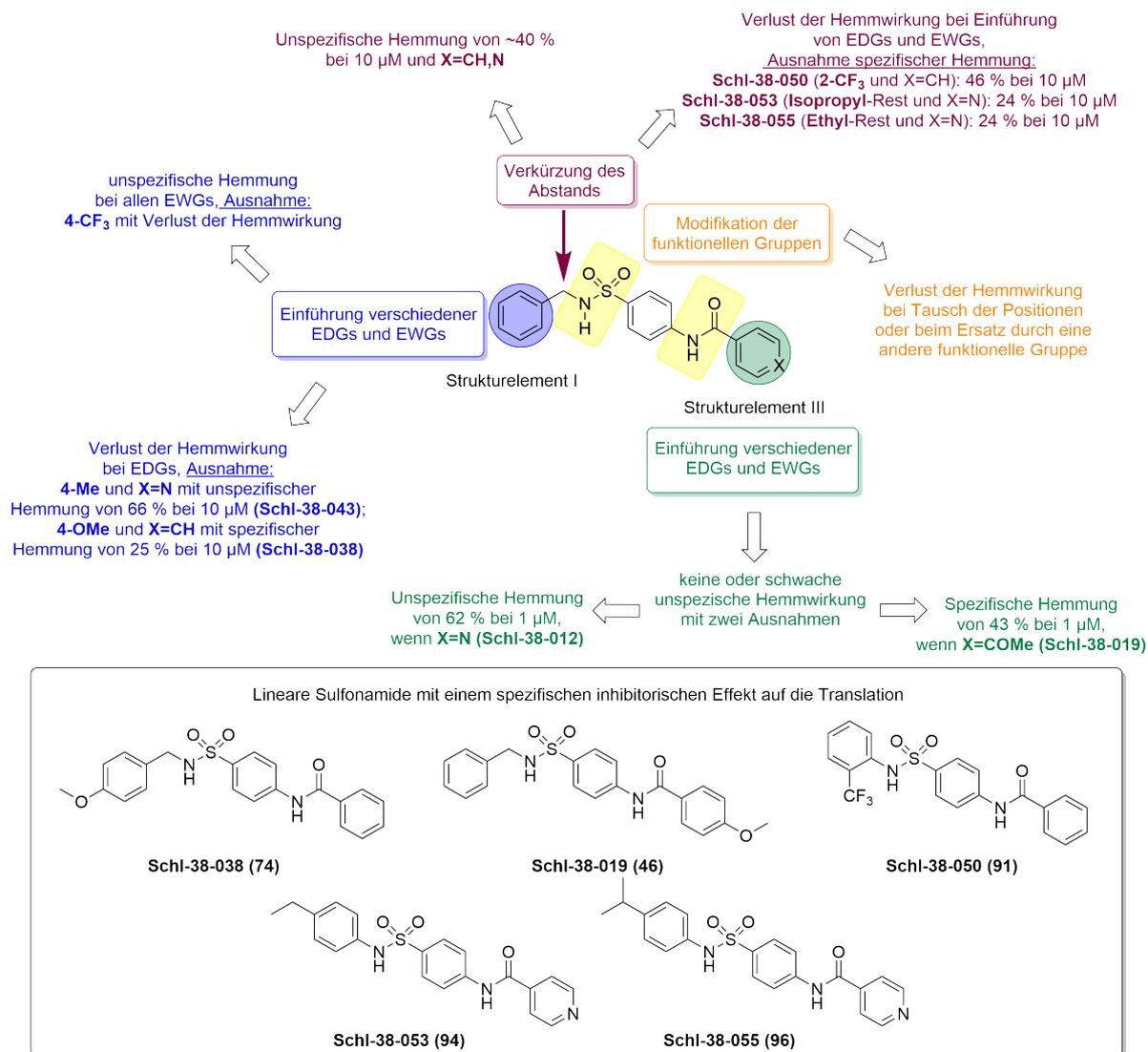


Abbildung 110: Übersicht der Modifikationen bei den linearen Sulfonamiden mit ihren Auswirkungen auf die Hemmung der Helikase.

Die Modifikationen der Strukturelemente I und III führten zu einigen Derivaten mit einem unspezifischen inhibitorischen Effekt auf die Translation und fünf Derivaten mit einem spezifischen Hemmeffekt (Abbildung 110). Die drei Verbindungen **Schl-38-038**, **Schl-38-053** und

Schl-38-055 haben bei einer Konzentration von 10 μM eine spezifische Hemmung auf die Translation von ca. 25 %. Bei **Schl-38-050** war bei derselben Konzentration eine deutlich höhere Hemmwirkung von 46 % zu beobachten, während **Schl-38-019** sogar bei einer Konzentration von 1 μM eine spezifische Hemmung der Translationseffizienz von $(\text{AG})_{15}$ von 43 % verursachte. Abschließend kann für die Stoffklasse der linearen Sulfonamide gesagt werden, dass von den 49 synthetisierten Derivaten fünf vielversprechende Derivate mit einem spezifischen Effekt auf die Translation identifiziert werden konnten. Im Vergleich zu der Grundstruktur **Schl-35-061** konnte nun die vorher fehlende eIF4A-Spezifität erreicht werden, ebenso wie die Aktivität der Translationsinhibition von 5 μM auf 1 μM gesteigert werden.

Die Stoffklassen der propellerartigen Sulfonamide und Carbonsäureamide basieren auf der Idee, die räumliche Geometrie der drei Ringe des Rocaglamat A zu imitieren. Der Verzweigungspunkt sollte eine einfache funktionelle Gruppe wie eine Sulfonamid- oder Carbonsäureamidgruppe sein. In diesen zwei Serien wurden unterschiedliche Abstände der Arylreste zum Sulfon- bzw. Carbonsäureamid-Stickstoff realisiert. Zudem wurden die Arylreste hinsichtlich ihrer elektronischen Eigenschaften modifiziert. Bei den propellerartigen Carbonsäureamiden wurden zusätzlich verschiedene Ringssysteme getestet. Der Großteil der Verbindungen zeigte keinen inhibitorischen Effekt auf die Translation. Bei vier propellerartigen Sulfonamiden konnte lediglich ein starker unspezifischer Hemmeffekt beobachtet werden. Auch bei den propellerartigen Carbonsäureamiden zeigten nur vier Derivate einen unspezifischen Effekt auf die Translation. Daher wurden die propellerartigen Derivate als Solche nicht weiter verfolgt. In Abbildung 111 sind diese Verbindungen gezeigt.

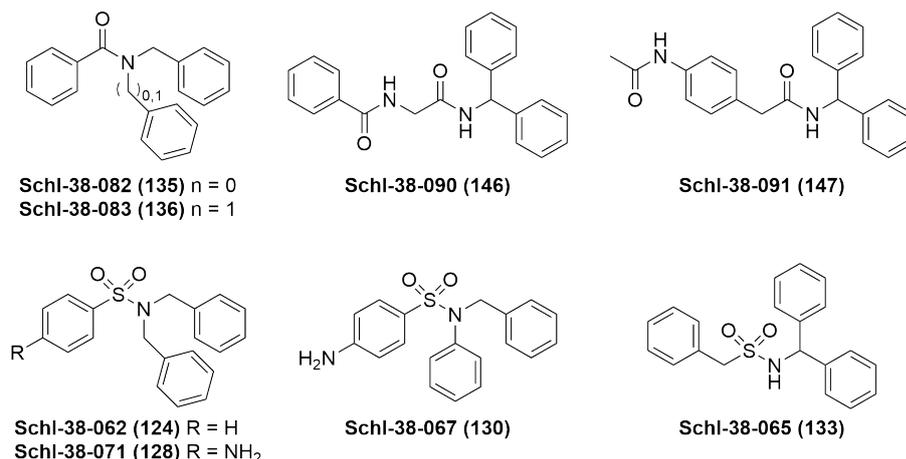


Abbildung 111: Propellerartige Carbonsäureamide und propellerartige Sulfonamide mit einem unspezifischen inhibitorischen Effekt im DLA.

Die Idee, die propellerartige räumliche Anordnung des RocA zu imitieren, führte zu einer weiteren Stoffklasse, den DIELS-ALDER-Addukten. Hier wurden drei Verbindungen synthetisiert, die in den biologischen Testungen auf eine spezifische eIF4A-Hemmwirkung keinen Effekt zeigten. Ein anderer Liganden-basierter Ansatz machte sich den Naturstoff Allolaurinterol zum Vorbild. Basierend auf dieser Verbindung wurden die Rhodanine entworfen. In dieser Serie wurden sieben unterschiedliche Rhodanine dargestellt. Auch hier war keine Hemmwirkung auf die Translation zu beobachten, sodass beide Stoffklassen nicht weiter verfolgt wurden.

Das Struktur-basierte Design begann mit der Publikation der Kristallstruktur der humanen Helikase.^[66] Im Rahmen dessen wurde die Stoffklasse der *N*-Acylaminosäureamide entworfen. Dabei wurden Struktur motive zur Adressierung der Bindetasche gewählt, die diese möglichst gut ausfüllen und alle wichtigen Wechselwirkungen mit den zwei RNA-Basen und den Aminosäuren Phe165 und Gln195 eingehen können. So wurde die Subtasche C mit einem Phenylglycin und die Subtasche B mit einem Phenyl- oder Benzylrest gefüllt. Die Subtasche A sollte mit unterschiedlichen aromatischen Ringssystemen adressiert werden. Alle Struktur motive sollten durch eine einfache Carbonsäureamidgruppe verknüpft werden. In Abbildung 50 ist schematisch die Entwicklung der Stoffklasse der *N*-Acylaminosäureamide gezeigt.

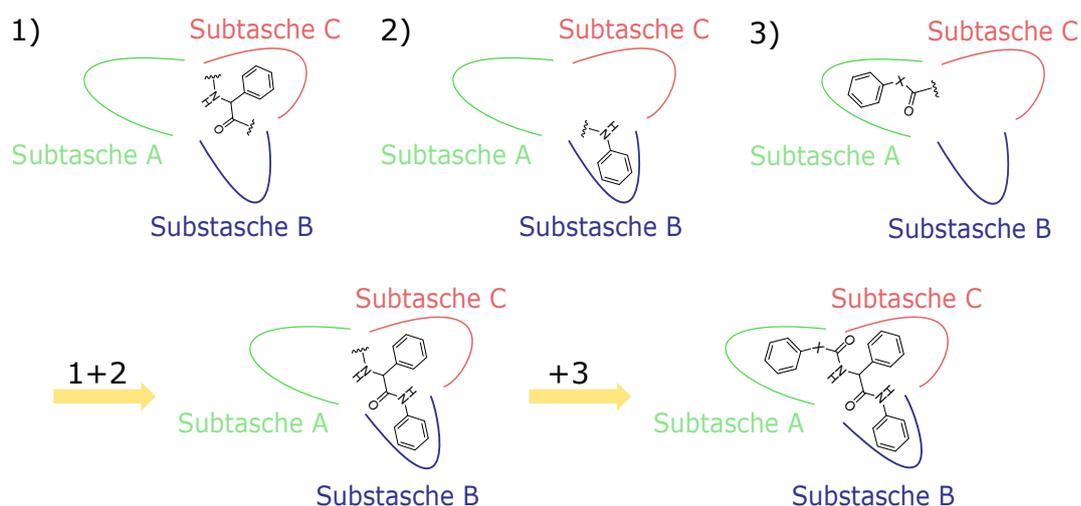


Abbildung 112: Struktur-basiertes Design der *N*-Acylaminosäureamide: Entwurf passender Struktur motive für die Subtaschen A, B und C schematisch dargestellt.

Die Entwicklung und Synthese der insgesamt 121 Verbindungen stellte den Hauptteil dieser Arbeit dar. Eine Übersicht mit allen Modifikationen und ihren Auswirkungen auf die Hemmung der Helikase ist in Abbildung 115 zu sehen. Anfangs wurde zunächst eine Grundstruktur für die Bindetasche des eIF4A-RNA-Komplexes gesucht. Dabei wurden vor allem die Strukturelemente B und C zunächst durch die Verwendung eines Phenylglycin- und eines Phenylrests einfach gehalten. Bei der Adressierung der Tasche A galt es, eine geeignete Struktur zu finden, die geometrisch betrachtet und im Idealfall auch von ihren elektrochemischen Eigenschaften passte. In dieser ersten Serie wurden 12 Derivate dargestellt und auf ihre Hemmwirkung evaluiert (Abbildung 115, grüner Kasten). Als Resultat wurden die Phenylelessigsäure- (**Schl-38-093**) und Phenylpropionsäure-Strukturen (**Schl-38-094**) als vielversprechende Partialstrukturen zur Adressierung der Subtasche A entdeckt. **Schl-38-093** verursachte eine spezifische Hemmung der Translation von 54 % und **Schl-38-094** eine von 49 % bei einer Konzentration von 10 μM . Jedoch konnte später im TSA keine signifikante Temperaturerhöhung und im antiviralen Test gegen Coronaviren keine Aktivität gefunden werden. Bei den restlichen Derivaten dieser Serie konnte kein signifikanter Effekt beobachtet werden. Nur das Benzoesäure-Derivat (**Schl-38-092**) verursachte eine unspezifische Hemmung der Translation von 41 % bei 10 μM , wohingegen keine Hemmwirkung bei dem Phenylbutansäure-Derivat (**Schl-38-096**) zu beobachten war. Folglich kann der Schluss gezogen werden, dass ein Abstand für das Verbindungsele-

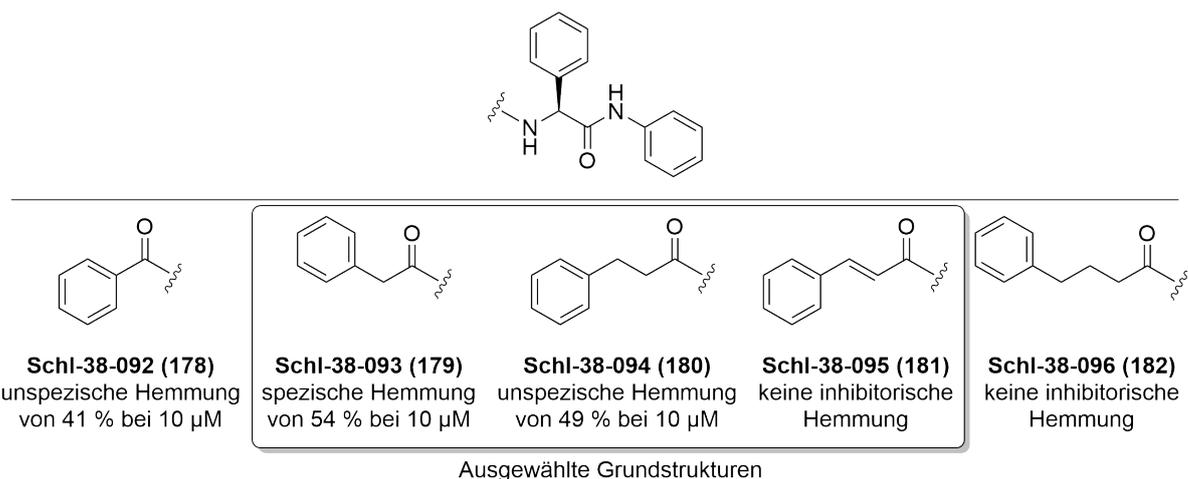


Abbildung 113: Zusammenfassung der Derivate mit unterschiedlichen Strukturmotiven A. Mit Blick auf die Hemmwirkung konnten Verbindungen mit einer Verbindungslänge von $n=1,2$ als eIF4a-spezifisch identifiziert werden. Im Folgenden konnte folglich die Phenylelessigsäure-, Phenylpropionsäure- und Zimtsäure-Struktur zur Adressierung der Subtasche A als Grundstruktur definiert werden.

ment X von $n=1-2$ bei den *N*-Acylaminosäureamiden optimal für die Bindetasche ist. Da das Zimtsäure-Derivat (**Schl-38-095**) im molekularen Docking vielversprechend aussah und wahrscheinlich aufgrund seiner geringen Löslichkeit kein gutes Ergebnis im DLA erzielen konnte, wurde der Beschluss gefasst, diese Struktur nichtsdestotrotz neben der Phenylelessigsäure und der Phenylpropionsäure-Struktur im weiteren Verlauf der Arbeit zu optimieren.

Bei den anschließenden Modifikationen der *N*-Acylaminosäureamide wurden jeweils alle drei Grundstrukturen (Phenylelessig-, Phenylpropion-, Zimtsäure) untersucht. Weitere Modifikationen des Molekülteil A erfolgten durch die Einführung verschiedener EDGs und EWGs (Abbildung 115, grüner Kreis). Bei allen 26 dargestellten Verbindungen war kein inhibitorischer Effekt auf die Translation zu beobachten, mit Ausnahme des Zimtsäure-Derivats (**Schl-38-163**, Abbildung 114). Hier konnte nur eine starke unspezifische Hemmung von 69 % bei 100 μ M erreicht werden. Bei der Modifikation des Molekülteil B konnte ebenfalls für 20 der 21 synthetisierten Verbindungen (Abbildung 115, blauer Kreis) kein inhibitorischer Effekt beobachtet werden. Einzig **Schl-38-155** (Abbildung 114) verursachte eine spezifische Hemmung von 26 % bei einer Konzentration von 10 μ M. Die simultane Einführung einer elektronenschieben-

den Methoxygruppe in die Arylreste der Molekülteile A und B führte zu keiner Verbesserung der Hemmwirkung. Alle drei Verbindungen wurden bereits nach dem WST-1-Assay wegen ihrer fehlenden Zytotoxizität ausgeschlossen und nicht im DLA getestet.

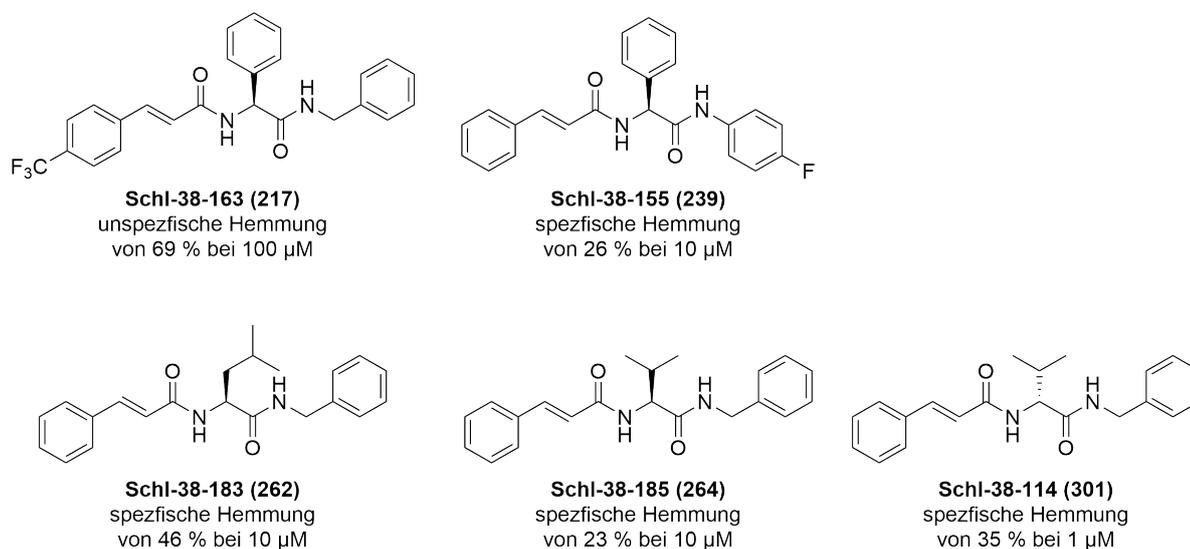


Abbildung 114: Zusammenfassung der aktiven *N*-Acylamino säureamide-Derivate.

Bei der Modifikation des Molekülteil C (Abbildung 115, roter Kreis) wurden ebenfalls Verbindungen aufgrund ihrer fehlenden Zytotoxizität im WST-1-Assay nicht im DLA getestet. Darüber hinaus gab es einige Verbindungen, die keinen oder nur einen unspezifischen Effekt im DLA hervorgerufen haben. Auffällig waren die Phenyllessigsäure-Derivate mit einem Anilid-Rest, die einen Leu, Ile und Val-Rest in der Tasche C besaßen. Sie zeigten nämlich einen unspezifischen Effekt, wohingegen die restlichen Derivate mit einer Phenylpropion- und Zimtsäurestruktur keine Hemmwirkung hatten. Dies ist schwer zu interpretieren, da sich dieses Muster nicht in der Serie mit dem Benzylamid-Rest widerspiegelt. Aus den 21 Verbindungen mit einer Modifikation im Molekülteil C konnten zwei mit einem spezifischen Effekt bei einer Konzentration von 10 μ M identifiziert werden (Abbildung 114). Dabei handelte es sich um die Zimtsäure-Derivate **Schl-38-183** mit einer Hemmung auf die Translation von 46 % und **Schl-38-185** mit 23 %. Diese beiden Verbindungen wurden auch auf eine antivirale Wirkung gegenüber Coronaviren getestet. Dabei konnte nur für **Schl-38-185** ein antiviraler Effekt gegenüber HCoV-229E ermittelt werden. Basierend auf diesem Ergebnis wurden weitere Valin-Derivate entworfen und synthetisiert. Dabei wurden 12 Verbindungen mit einer Modifi-

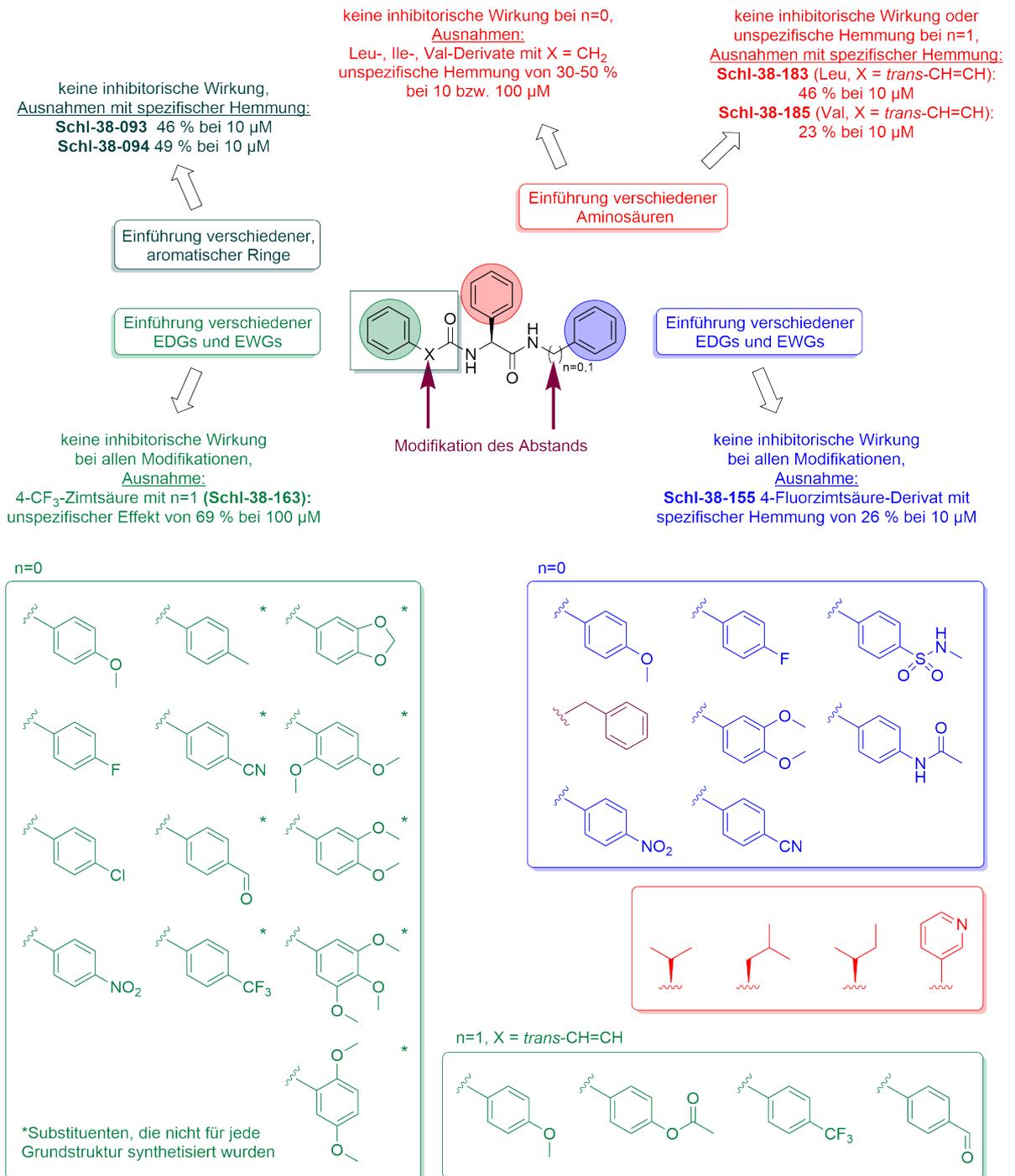


Abbildung 115: Übersicht der Modifikationen der drei Grundstrukturen aus der Stoffklasse der *N*-Acylaminosäureamide und ihre Auswirkungen auf die Hemmung der Helikase.

kation im Molekülteil A (Abbildung 116, grün) und 15 Verbindungen mit einer Modifikation im Molekülteil B (Abbildung 116, blau) dargestellt. Wiederum wurde im Molekülteil B der Abstand zwischen dem Carbonsäureamid-Stickstoff und dem Arylrest durch die Verwendung eines Phenyl- und Benzylrests variiert. Leider konnte bei allen Verbindungen dieser Serie kein inhibitorischer Effekt auf die Translation beobachtet werden.

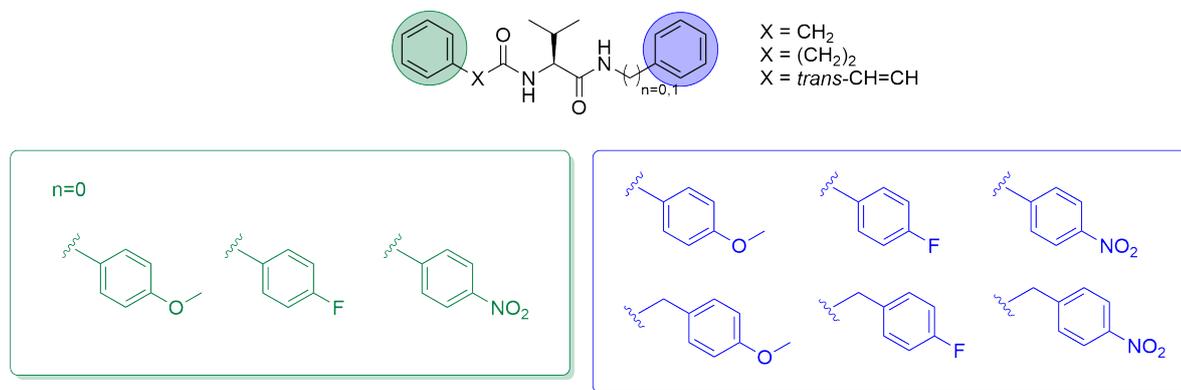


Abbildung 116: Übersicht der Modifikationen der drei Grundstrukturen aus der Stoffklasse der *N*-Acylaminosäureamide mit einem Valin in der Subtasche C und ihre Auswirkungen auf die Hemmung der Helikase.

Des Weiteren wurden die entsprechenden D-Enantiomere synthetisiert und getestet. Dabei konnte nur eine spezifische Hemmung von 35 % bei einer Konzentration von 1 μM für das Zimtsäure-Derivat mit einem D-Valin im Molekülteil C beobachtet werden. Dies weist auf ein Entwicklungspotential hin. Als nächster Schritt wäre ein Test auf einen antiviralen Effekt sinnvoll.

Nach der Publikation der Kristallstruktur der Helikase wurden die Stoffklassen der linearen Sulfonamide und propellerartigen Sulfonamide mittels molekularem Docking erneut analysiert. Dabei zeigte sich, dass die linearen Sulfonamide nur zwei Subtaschen, während die propellerartigen Sulfonamide zwar drei Subtaschen, dafür aber nur unvollständig ausfüllen. Aus diesen Erkenntnissen wurde eine Verzweigung der linearen Sulfonamide als sinnvoll erachtet, um alle drei Subtaschen des eIF4A-RNA-Komplexes zu adressieren und die Subtasche A durch einen zusätzlichen Phenylrest besser zu füllen (Abbildung 86). So wurden zehn verschiedene verzweigte Sulfonamide mit unterschiedlichen Abständen der die Subtaschen B

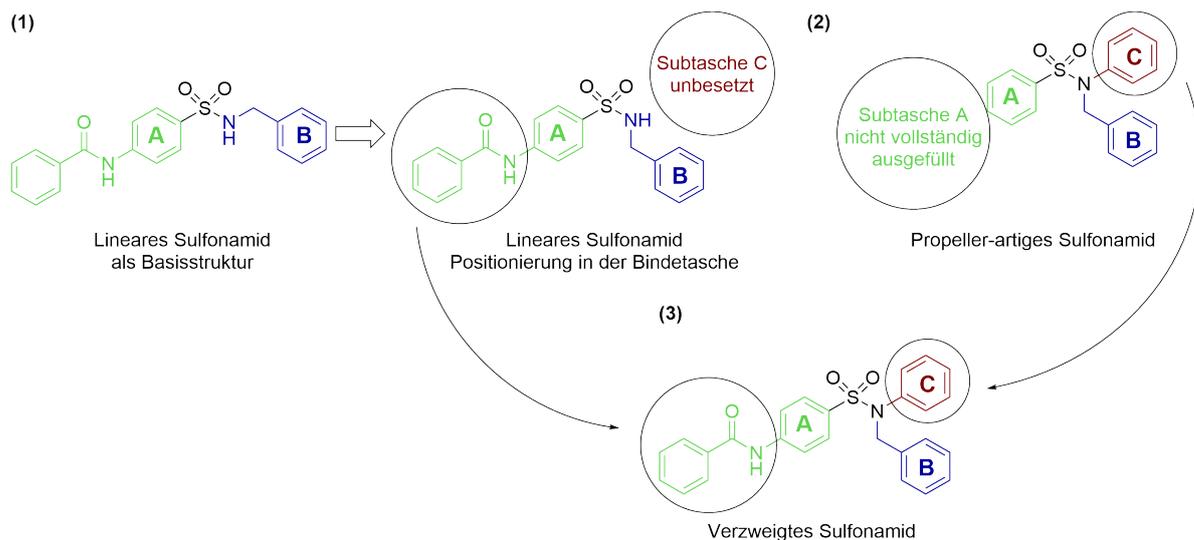


Abbildung 117: Entwicklung der Stoffklasse der verzweigten Sulfonamide: (1) Lineare Sulfonamide als Basisstruktur: Ein Strukturmotiv zur Adressierung der Subtasche C fehlt. (2) Propellerartige Sulfonamide besetzen alle drei Subtaschen. Die Kombination der Strukturelemente liefert die verzweigten Sulfonamide, die alle drei Subtaschen ganz (auch B, C) oder weitgehend (A) ausfüllen.

und C adressierenden Phenylreste und Substituenten an den drei Ringen synthetisiert. Drei der zehn verzweigten Sulfonamide stellten sich als spezifische Hemmstoffe bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ heraus (Abbildung 118). Ihr inhibitorischer Effekt der Translationseffizienz von $(\text{AG})_{15}$ beträgt bei **Schl-38-072** und **Schl-38-081** etwas mehr als 20 %, während **Schl-38-080** sogar eine Hemmung der Translation von 36 % verursachte.

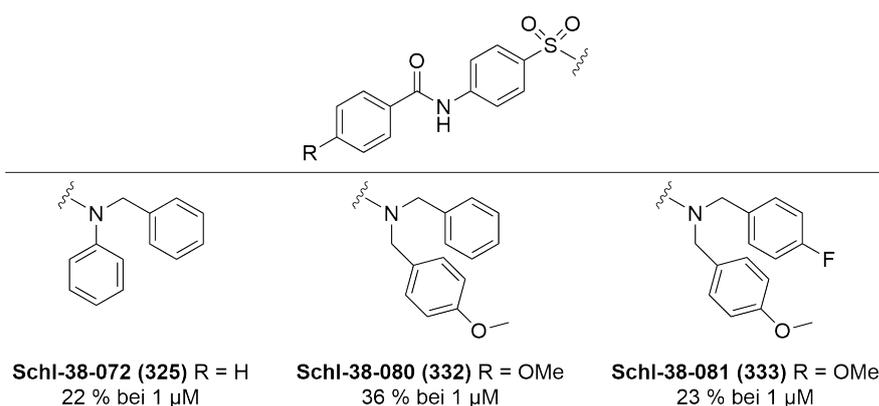


Abbildung 118: Übersicht der verzweigten Sulfonamide mit einer spezifischen Hemmung der Translation.

Die Stoffklasse der verzweigten Sulfonamide birgt also noch viel Potential für ein rationales Design der Helikase-Hemmstoffe und wird in weiteren Arbeiten systematisch in all ihren Komponenten optimiert werden. In dieser Arbeit konnte so der Grundstein für künftige Arbeiten gelegt werden. Neben den biologischen Untersuchungen zur Helikase wurden durch den Arbeitskreis WEBER antivirale Tests einiger linearer Sulfonamide gegen das *Rift-Valley-Fever-Virus* durchgeführt. Dabei konnte bei **Schl-38-012** eine signifikante Hemmung der Produktion der Virus-Partikel im Bereich einer halben Log-Stufe bei einer Konzentration von 20 μM beobachtet werden. Dies zeigt Potential für weitere Entwicklungen.

In Kooperation mit dem Arbeitskreis GREVELDING wurden ausgewählte Verbindungen auf ihren antischistosomalen Effekt gegen adulte *Schistosoma mansoni* Pärchen untersucht. Es konnten zwei aktive Verbindungen **Schl-35-061** und **Schl-38-009** aus der Stoffklasse der linearen Sulfonamide identifiziert werden. Beide Verbindungen führten bei einer Konzentration von 25 μM zum vollständigen Erliegen der Eiproduktion und verursachten morphologische Veränderungen in Form von Darmdilatationen. In Abbildung 119 sind die aktiven Verbindungen mit einem antiviralen oder antischistosomalen Effekt dargestellt.

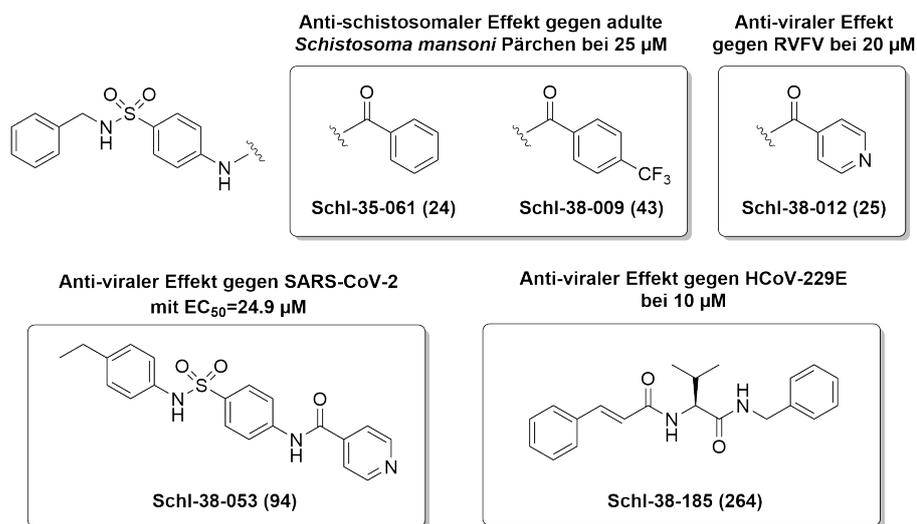


Abbildung 119: Zusammenfassung der aktiven Verbindungen mit einem antiviralen oder antischistosomalen Effekt.

Die biologischen Testungen auf einen antiviralen Effekt gegen Coronaviren wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe ZIEBUHR durchgeführt. So wurden alle im DLA vielversprechenden Verbindungen zunächst gegen HCoV-229E getestet. Dabei konnte ein Valin-Derivat (**Schl-38-185**) aus der Stoffklasse der *N*-Acylaminosäureamide als wirksam identifiziert werden. **Schl-38-185** erreichte bei einer Konzentration von 10 μM eine Reduktion des Virustiters um eine halbe Log-Stufe und stellt einen vielversprechenden Ausgangspunkt für weitere Entwicklungen dar. Das lineare Sulfonamid **Schl-38-053** zeigte gegen SARS-CoV-2 eine Reduktion des Virustiters um eine ganze Log-Stufe bei einer Konzentration von 50 μM und besitzt einen EC_{50} -Wert von 24.9 μM . Dieses Ergebnis ist sehr vielversprechend und rückt die Stoffklasse der Sulfonamide wieder in den Fokus der weiteren Forschung und Entwicklung. Dieser antivirale Effekt im mikromolaren Bereich verdeutlicht, dass die Sulfonamide noch viel Potential besitzen.

Mit der vorliegenden Arbeit konnten zwei Stoffklassen etabliert werden, aus denen Verbindungen mit einer Hemmung der eIF4A-abhängigen Translationseffizienz und einem antiviralen Effekt hervorgegangen sind. Beide Verbindungsklassen bergen weiteres Entwicklungspotential. So besteht zum Beispiel die Möglichkeit die Argininseitenketten am Ende der Subtasche A zu adressieren oder durch ein geeignetes Strukturelement in der Subtasche C eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zu dem Asp198 aufzubauen (Abbildung 120). Alle drei die Subtaschen A, B und C adressierenden Molekülteile könnten hinsichtlich ihrer elektronischen Eigenschaften zum Beispiel durch die Verwendung von verschiedenen Heteroaromaten optimiert werden. Alle beschriebenen Modifikationen könnten auch auf die Stoffklasse der *N*-Acylaminosäureamide angewendet werden und sind in Abbildung 121 dargestellt. Hier könnte zusätzlich noch das Verbindungselement X variiert werden, um eine weniger peptidische Struktur der potentiellen Hemmstoffe zu erreichen.

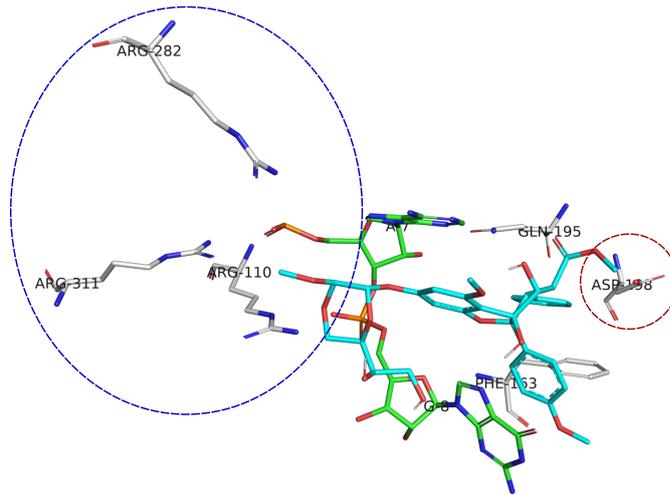


Abbildung 120: Dockingpose von Silvestrol mit den wichtigen Basen und Seitenketten der Bindetasche. Die blaue Markierung zeigt die mögliche Adressierung der Arginin-Seitenketten durch den Dioxanring und die rote Markierung den Bereich für eine potentielle Wasserstoffbrücke zu Asp198.

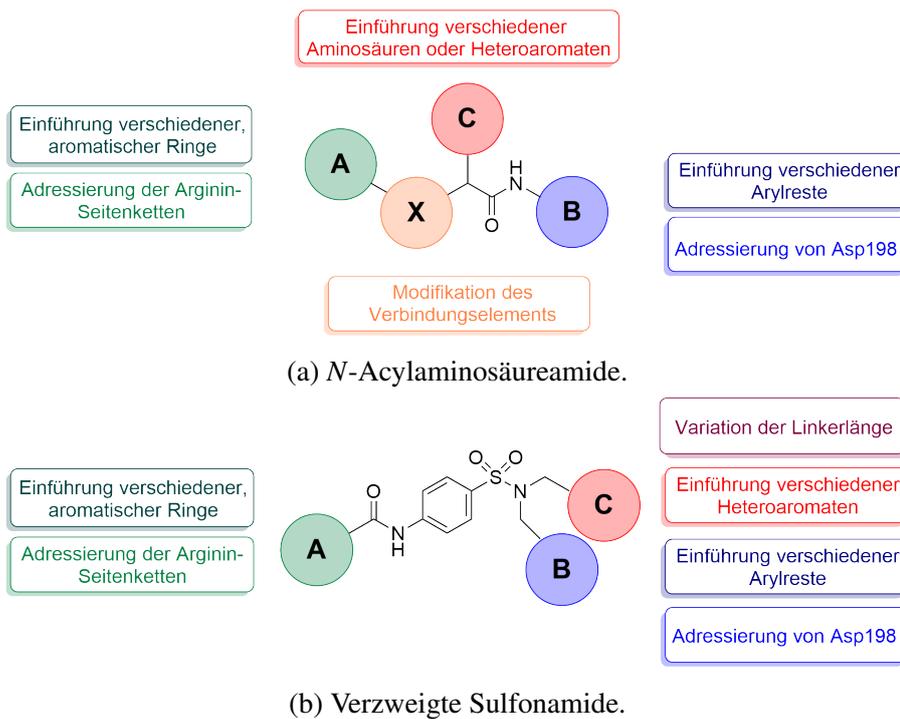


Abbildung 121: (a) und (b) Ausblick der möglichen Modifikationen für die Stoffklasse der verzweigten Sulfonamide und der N-Acylaminosäureamide in den nächsten Arbeiten.

Abschließend ist somit festzustellen, dass mit der vorliegenden Arbeit die Grundlagen für zwei nachfolgende Dissertationen auf dem Gebiet der *N*-Acylaminosäuremide und der verzweigten Sulfonamide gelegt wurden.

5 Literaturverzeichnis

- [1] T. G. Villa, A. G. Sánchez, T. de Miguel, A. Sánchez-Pérez, *Arch. Microbiol.* **2021**, *203*, 443-464.
- [2] M. P. Christy, Y. Uekusa, L. Gerwick, W. H. Gerwick, *J. Nat. Prod.* **2021**, *84*, 161-182.
- [3] A. S. Luring, P. N. Malani, *JAMA*, published online August 13, **2021**. doi:10.1001/jama.2021.14181.
- [4] P. R. Krause et al, *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 179-186.
- [5] <https://covid19.who.int/>, aufgerufen am 08.07.2021.
- [6] https://www.uni-giessen.de/fbz/fb07/media/sars-cov-2-virion/image_view_fullscreen, aufgerufen am 08.07.2021.
- [7] http://viperdb.scripps.edu/Image_Details.php?VDB=5z9w&type=capsid, aufgerufen am 08.07.2021.
- [8] M. Rojas et al, *J. Autoimmun.* **2020**, *106*, 102375.
- [9] F. Hansen, H. Feldmann, M. A. Jarvis, *Expert. Opin. Inv. Drug* **2021**, *30*, 201-226.
- [10] H. Feldmann, A. Sprecher, T. W. Geisbert, *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 1832-1842.
- [11] <https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/news/artikel/2016/03/30/who-hebt-ebola-notstand-auf>, aufgerufen am 02.07.2021.
- [12] K. Al-Tameemi, R. Kabakli, *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **2019**, *12*, 57-62.
- [13] https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/ervebo-epar-medicine-overview_de.pdf, aufgerufen am 01.07.2021.
- [14] <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/prevention/index.html>, aufgerufen am 01.07.2021.
- [15] <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-treatment-ebola-virus>, aufgerufen am 05.07.2021.

- [16] <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-approves-treatment-ebola-virus>, aufgerufen am 05.07.2021.
- [17] S. Mulangu et al, *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 2293-2303.
- [18] <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/history/2014-2016-outbreak/index.html>, aufgerufen am 01.07.2021.
- [19] <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/outbreaks/drc/overview.html>, aufgerufen am 01.07.2021.
- [20] https://www.researchgate.net/figure/Map-of-the-spreading-of-the-Ebola-virus-in-2014-source-WHO_fig1_341322919, aufgerufen am 05.07.2021.
- [21] C. S. Adamson et al, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 3647–3655.
- [22] E. P. Tchesnokov et al, *Viruses* **2019**, *11*, 326.
- [23] M. G. Santoro, E. Carafoli, *Biochem. Bioph. Res. Co.* **2021**, *538*, 145-150.
- [24] S. Kotta et al, *Front. Mol. Biosci.* **2020**, *7*, 606393.
- [25] P. V'kovski, A. Kratzel, S. Steiner, H. Stalder, V. Thiel, *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, *19*, 155-170.
- [26] J. Wang et al, *Biochemistry* **2021**, *60*, 1869-1875.
- [27] S. K. Mishra, T. Tripathi, *Acta Trop.* **2021**, *214*, 105778.
- [28] D. Wu, T. Wu, Q. Liu, Z. Yang, *Int. J. Infect. Dis.* **2020**, *94*, 44-48.
- [29] B. Hu, H. Guo, P. Zhou, Z. Shi, *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, *19*, 141-154.
- [30] H. Wang et al, *Eur. J. Clin. Microbiol.* **2020**, *39*, 1629-1635.
- [31] G. U. Jeong et al, *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1723.
- [32] S. Xiu et al, *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 12256-12274.

- [33] F. Krammer, *Nature* **2020**, 586, 516-527.
- [34] B. Salzberger et al, *Infection* **2021**, 49, 233-239.
- [35] B. D. Kevadiya et al, *Nat. Mater.* **2021**, 20, 593-605.
- [36] V. G. da Costa, M. L. Moreli, M. V. Saivish, *Arch. Virol.* **2020**, 165, 1517-1526.
- [37] <https://www.zusammengegencorona.de/informieren/sich-und-andere-schuetzen/die-aha-formel/>, aufgerufen am 15.07.2021.
- [38] <https://www.zusammengegencorona.de/impfen/impfstoffe/wirksamkeit-und-sicherheit/>, aufgerufen am 15.07.2021.
- [39] <https://www.zusammengegencorona.de/impfen/basiswissen-zum-impfen/risiken-und-nebenwirkungen/>, aufgerufen am 15.07.2021.
- [40] M. Xie, Q. Chen, *Int. J. Infect. Dis.* **2020**, 94, 119-124.
- [41] <https://covid19.who.int/>, aufgerufen am 01.10.2021.
- [42] N. Petrosillo et al, *Clin. Microbiol. Infec.* **2020**, 26, 729-734.
- [43] J. P. Moore, P. A. Offit, *JAMA* **2021**, 325, 821-822.
- [44] https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Virusvariante.html, aufgerufen am 15.07.2021.
- [45] https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/DESH/Bericht_VOC_2021-06-30.pdf?__blob=publicationFile, aufgerufen am 15.07.2021.
- [46] A. Awadasseid, Y. Wu, Y. Tanaka, W. Zhang, *Int. J. Biol. Sci.* **2021**, 17, 8-19.
- [47] Z. Shyr, K. Gorshkov, C. Z. Chen, W. Zheng, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2020**, 375, 127-138.
- [48] E. Callaway, N. Spencer, *Nature* **2020**, 580, 576-577.

- [49] Zahlen aus Exel-Datei der WHO: COVID19 - Landscape of novel coronavirus candidate vaccine development worldwide, heruntergeladen am 09.07.2021.
- [50] M. Hoffmann et al, *EBioMedicine* **2021**, *65*, 103255.
- [51] H. Montero, G. Pérez-Gil, C. L. Sampieri, *Virus Genes* **2019**, *55*, 267–273.
- [52] G. Taroncher-Oldenburg et al, *Microorganisms* **2021**, *9*, 540.
- [53] A. Z. Andreou, D. Klostermeier, *RNA Biol* **2013**, *10*, 19–32.
- [54] A. K. Banerjee, *Microbiol. Rev.* **1980**, *44*, 175–205.
- [55] S. K. Naineni et al, *RNA* **2020**, *26*, 541–549.
- [56] J. Tillotson et al, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 4082–4085.
- [57] N. Pardi, D. Weissmann, *Nat. Biomed. Eng.* **2020**, *4*, 1128–1133.
- [58] B. M. Trost et al, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9022–9024.
- [59] B. Gerard, R. Cencic, J. Pelletier, J. A. Porco, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7831–7834.
- [60] P. Menzel, Synthese und Untersuchung von Sulfonamid-Derivaten als potentielle Inhibitoren des eIF4F-Komplexes, Masterarbeit, Philipps-Universität Marburg, 2016.
- [61] M. K. Grøftehauge, N. R. Hajizadeh, M. J. Swann, E. Pohl, *Acta Crystallogr.* **2015**, *71*, 36-44.
- [62] K. Huynh, C. L. Partch, *Curr. Protoc. ProteinSci.* **2015**, *79*, 28.9.1-28.9.14.
- [63] F. W. Schulte, Untersuchung der antiviralen Wirkung des Naturstoffs Silvestrol - Etablierung der Helikase eIF4A als Zielstruktur einer neuen Virusstatikaklasse, Dissertation, Philipps-Universität Marburg, 2018.

- [64] W. Obermann, Charakterisierung der antiviralen Aktivität von Rocaglamid-Derivaten und Validierung der humanen RNA-Helikase eIF4A als Target, Dissertation, Philipps-Universität Marburg, 2020.
- [65] M. Nakanishi et al, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5792–5795.
- [66] S. Iwasaki et al, *Mol. Cell* **2019**, *73*, 1–11.
- [67] C. Müller et al, *Antivir. Res.* **2020**, *175*, 104706.
- [68] C. Müller et al, *Antivir. Res.* **2018**, *150*, 123-129.
- [69] R. Cencic, J. Pelletier, *Translation* **2016**, *4*, e1137381.
- [70] C. J. Fletcher et al, *Tetrahedron*, **2012**, *68*, 7598-7604.
- [71] C. S. Vairappan et al, *Letter...Planta Med*, **2004**, *70*, 1087-1090.
- [72] J. Tillotson et al, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 4082-4085.
- [73] A. M. Jacobine, G. H. Posner, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 8121–8125.
- [74] A. Kudelko, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 3616-3625.
- [75] D. J. Abraham, Structure-Based Drug Design - A Historical Perspective and the Future, 2007, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA, USA, Elsevier Ltd.
- [76] A. C. Anderson, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 787–797.
- [77] N. Biedenkopf et al, *Antivir. Res.* **2017**, *137*, 76-81.
- [78] <https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery/components/gold/>, aufgerufen am 18.08.2021.
- [79] https://www.ccdc.cam.ac.uk/support-and-resources/ccdcresources/GOLD_User_Guide.pdf, aufgerufen am 19.05.2021.
- [80] <https://openmolecules.org/datawarrior/>, aufgerufen am 18.08.2021.

- [81] <https://perkinelmerinformatics.com/products/research/chemdraw/>, aufgerufen am 18.08.2021.
- [82] <https://pymol.org/2/>, aufgerufen am 18.08.2021.
- [83] E. Breitmaier, G. Jung, *Organische Chemie*, 2014, 7. Auflage, Thieme, S. 805.
- [84] C. Bissantz, B. Kuhn, M. Stahl, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5061–5084.
- [85] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, Section 1.3, Chemical Bonds in Biochemistry, 2002, 5. Auflage, New York. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22567/>
- [86] J. T. Ernst et al, *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 5879-5955.
- [87] S. Alla et al, Pharmacore Inc., 2003, Patent WO 03/010130 A1, PCT/US02/23336.
- [88] *Organikum*, 23. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009, S. 520.
- [89] James et al., *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6038-6047.

6 Lebenslauf

Aus Gründen des Persönlichkeitsschutzes wird von der elektronischen Veröffentlichung des Lebenslaufs abgesehen.

7 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**„Liganden- und Struktur-basiertes Design und Entwicklung potentieller
eIF4A-Inhibitoren“**

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 an der Lahn, den 05. Oktober 2021

(Thi Lan Phuong Pham)

8 Anhang

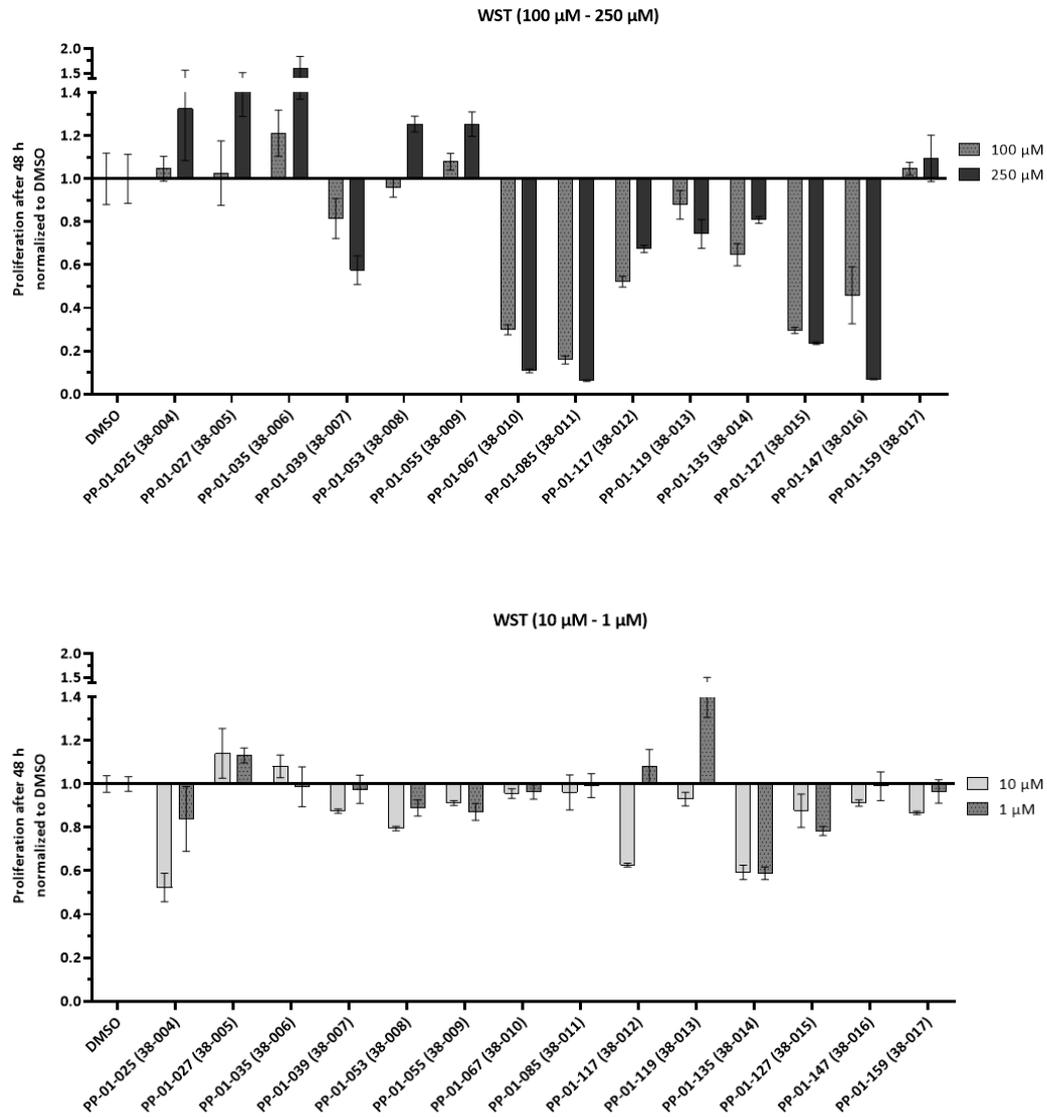
8.1 Zusammenfassung der Ergebnisse aller im TSA getesteten

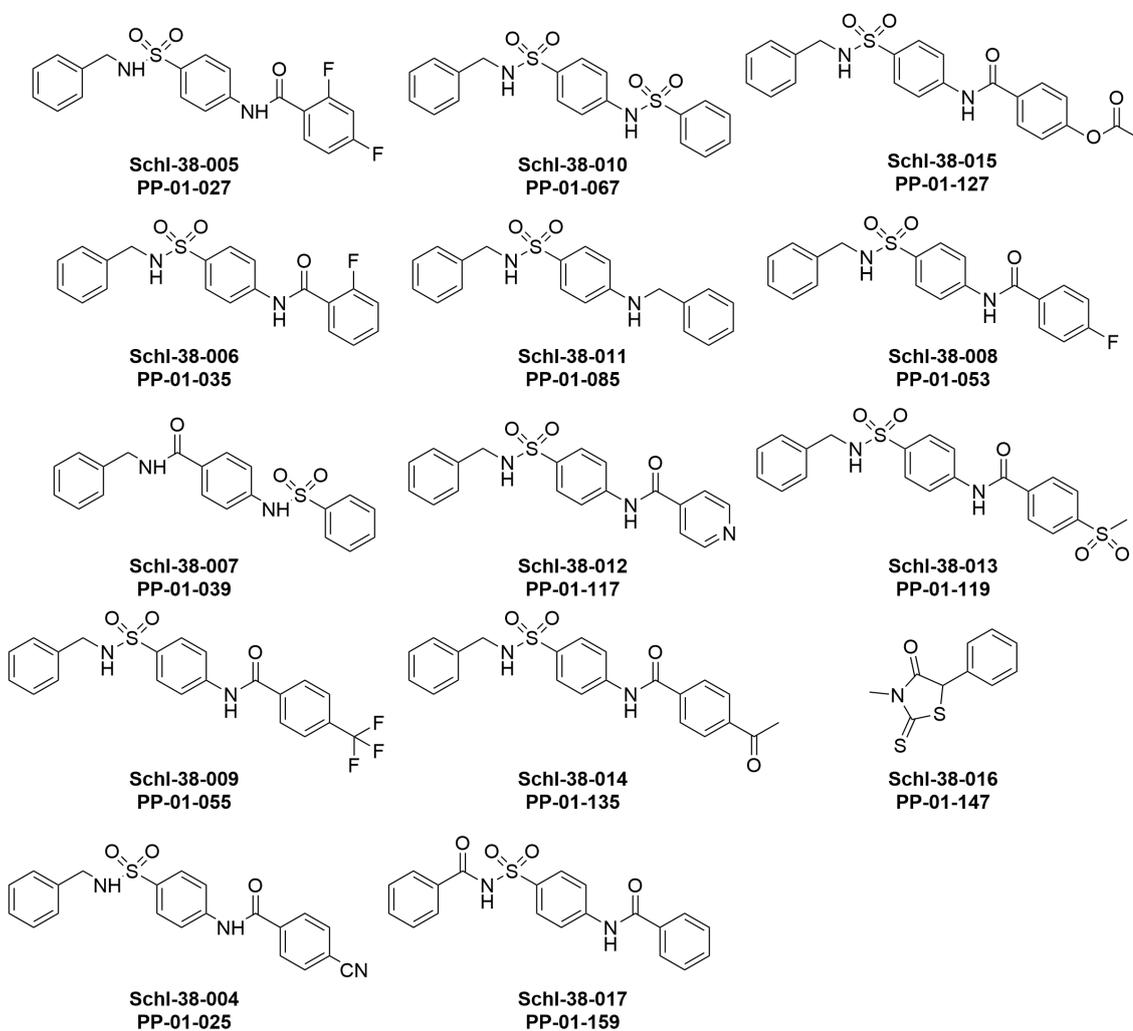
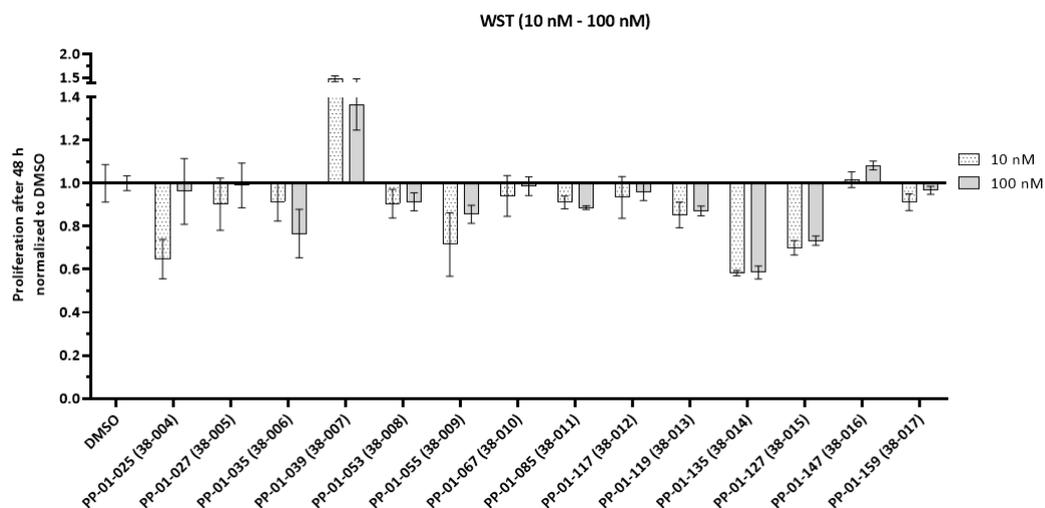
Verbindungen

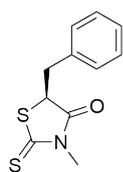
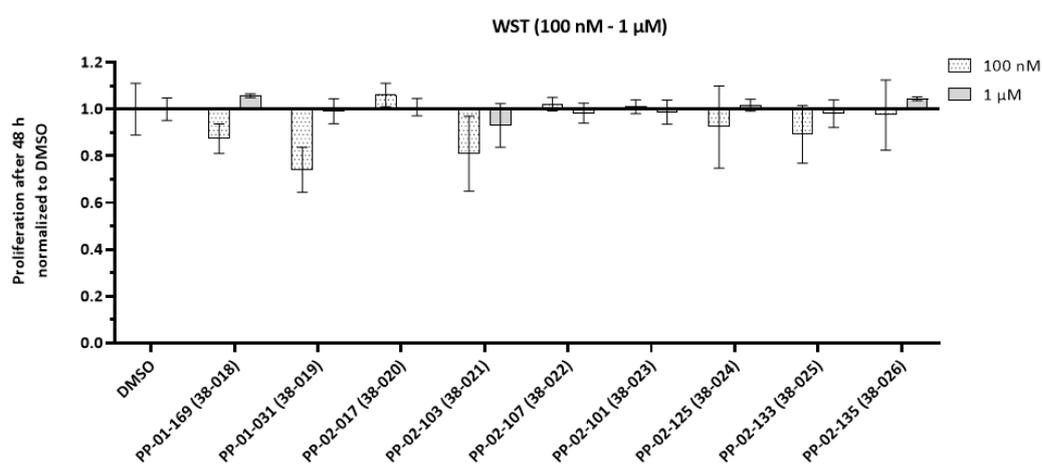
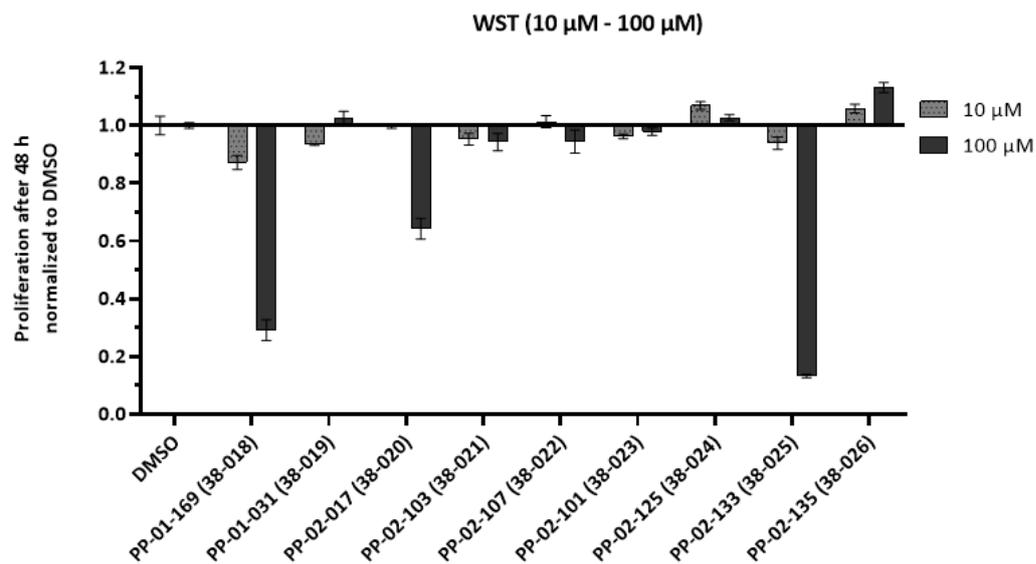
Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse aller im TSA getesteten Verbindungen.

Lineare Sulfonamide	TSA ΔT_m [°C]	Rhodanine	TSA ΔT_m [°C]
Schl-38-010	0.49 (\pm 0.03)	Schl-38-016	- 1.77 (\pm 0.67)
Schl-38-014	1.18 (\pm 0.08)	Schl-38-018	- 0.69 (\pm 0.09)
Schl-38-015	0.95 (\pm 0.48)	Schl-38-020	- 1.54 (\pm 0.28)
Schl-38-019	1.78 (\pm 0.35)		
Schl-38-038	2.87 (\pm 1.04)		
Schl-38-050	1.15 (\pm 0.06)		
Schl-38-051	0.92 (\pm 0.03)		
Schl-38-054	0.85 (\pm 0.03)		
Schl-38-055	1.46 (\pm 0.07)		
Propeller Sulfonamide	TSA ΔT_m [°C]	Verzweigte Sulfonamide	TSA ΔT_m [°C]
Schl-38-066	- 0.16 (\pm 0.03)	Schl-38-072	1.26 (\pm 0.10)
Schl-38-067	0.76 (\pm 0.04)		
Schl-38-068	0.21 (\pm 0.42)	Schl-38-073	1.37 (\pm 0.02)
Schl-38-069	1.00 (\pm 0.06)		
Schl-38-070	0.51 (\pm 0.08)	Schl-38-075	1.56 (\pm 0.11)
Schl-38-071	0.97 (\pm 0.05)		
DIELS-ALDER-Add.	TSA ΔT_m [°C]	Carbonsäureamid	TSA ΔT_m [°C]
Schl-38-23	- 1.34 (\pm 0.08)	Schl-38-086	0.19 (\pm 0.02)
Dicarbonsäureamide	TSA ΔT_m [°C]		
Schl-38-093	- 0.37 (\pm 0.40)	Schl-38-141	- 0.09 (\pm 0.12)
Schl-38-094	- 0.63 (\pm 0.05)	Schl-38-144	0.81 (\pm 0.05)
Schl-38-099	1.20 (\pm 0.06)	Schl-38-154	0.06 (\pm 0.06)
Schl-38-101	- 0.60 (\pm 0.53)	Schl-38-155	0.26 (\pm 0.04)
Schl-38-102	1.34 (\pm 0.02)	Schl-38-156	1.11 (\pm 0.06)
Schl-38-103	1.12 (\pm 0.05)	Schl-38-157	0.69 (\pm 1.22)
Schl-38-107	- 0.02 (\pm 0.04)	Schl-38-161	0.16 (\pm 0.27)
Schl-38-108	- 0.06 (\pm 0.07)	Schl-38-172	- 0.40 (\pm 0.09)
Schl-38-118	0.24 (\pm 0.06)	Schl-38-175	- 0.01 (\pm 0.06)
Schl-38-119	- 0.58 (\pm 0.29)	Schl-38-183	1.51 (\pm 0.01)
Schl-38-120	0.18 (\pm 0.01)	Schl-38-185	- 1.45 (\pm 0.39)
Schl-38-128	- 0.14 (\pm 0.12)	Schl-38-186	0.08 (\pm 0.06)
Schl-38-130	0.28 (\pm 0.06)	Schl-38-187	0.07 (\pm 0.03)
Schl-38-131	0.50 (\pm 0.14)	Schl-38-189	0.06 (\pm 0.09)

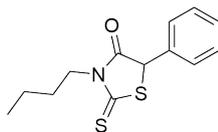
8.2 Zusammenfassung der Ergebnisse aller im WST getesteten Verbindungen



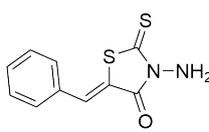




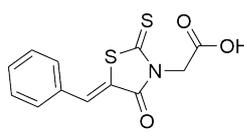
Schl-38-018
PP-01-169



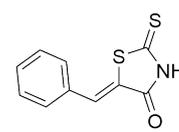
Schl-38-020
PP-02-017



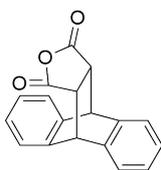
Schl-38-024
PP-02-125



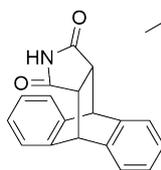
Schl-38-026
PP-02-135



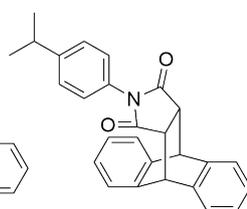
Schl-38-025
PP-02-133



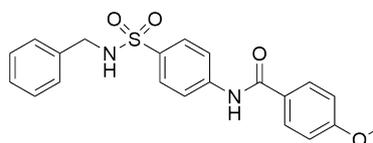
Schl-38-021
PP-02-103



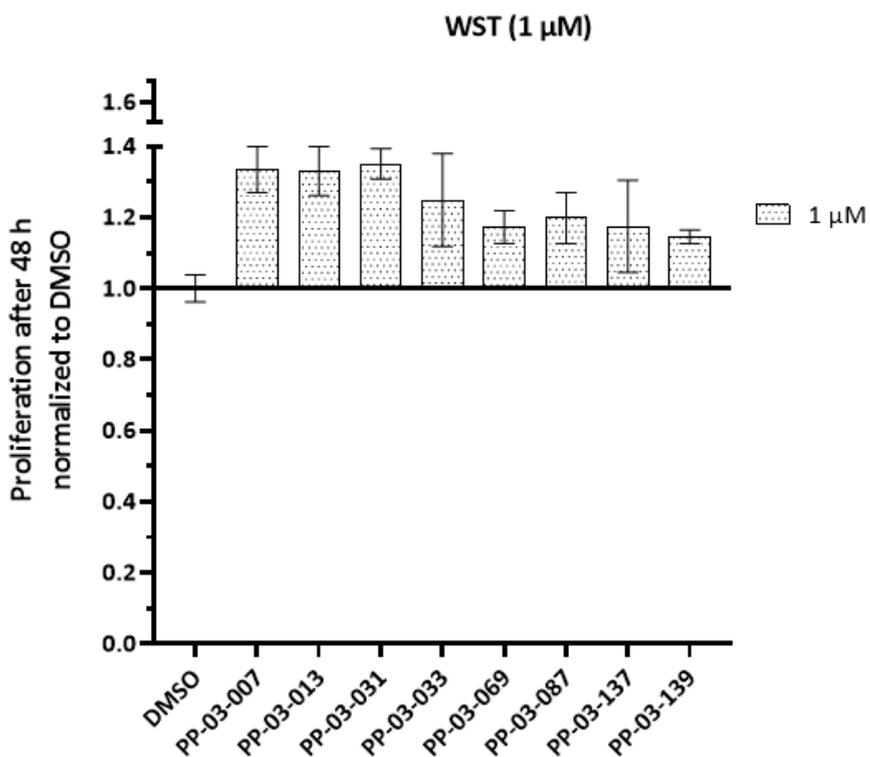
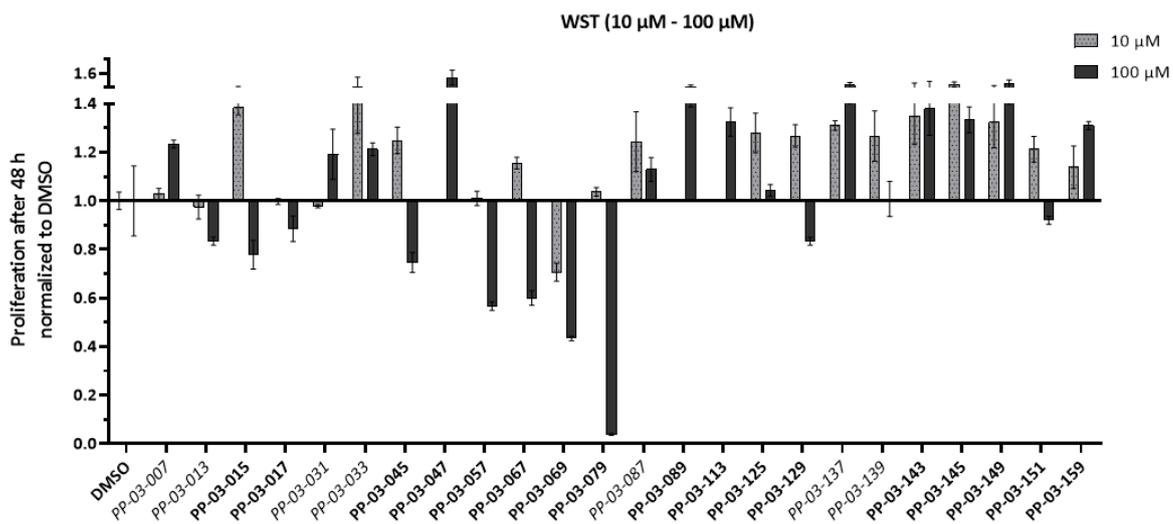
Schl-38-022
PP-02-107

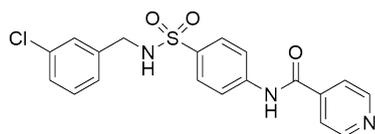


Schl-38-023
PP-02-101

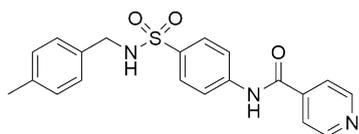


Schl-38-019
PP-01-031

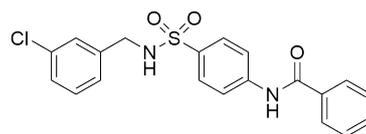




PP-03-013
Schl-38-033



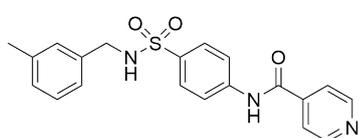
PP-03-045
Schl-38-045



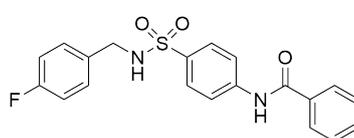
PP-03-129
Schl-38-039



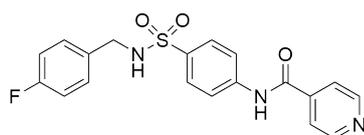
PP-03-007
Schl-38-031



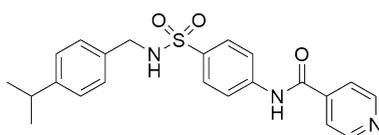
PP-03-017
Schl-38-043



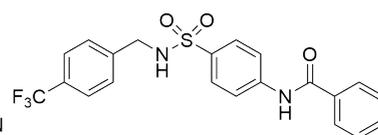
PP-03-137
Schl-38-034



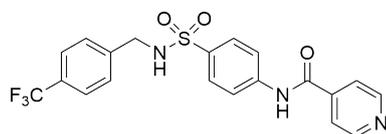
PP-03-159
Schl-38-035



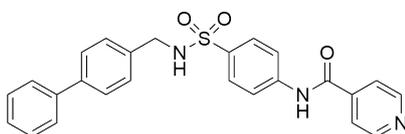
PP-03-015
Schl-38-047



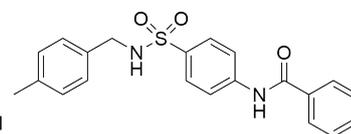
PP-03-149
Schl-38-036



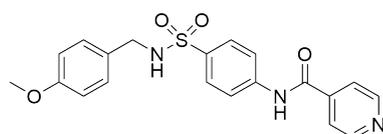
PP-03-033
Schl-38-037



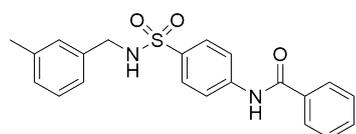
PP-03-047
Schl-38-041



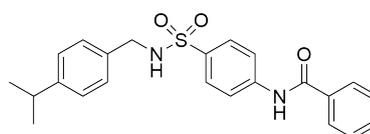
PP-03-087
Schl-38-044



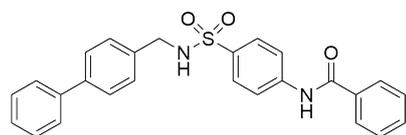
PP-03-031
Schl-38-039



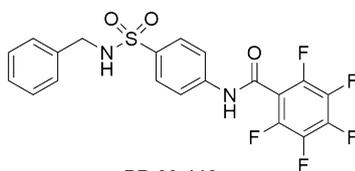
PP-03-143
Schl-38-042



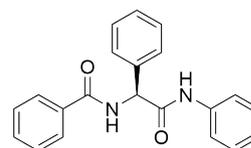
PP-03-145
Schl-38-046



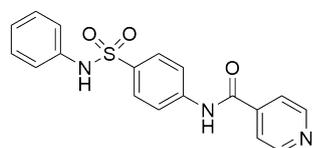
PP-03-089
Schl-38-040



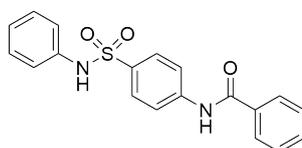
PP-03-113
Schl-38-029



PP-03-151
Schl-38-092



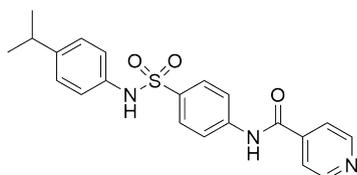
PP-03-057
Schl-38-049



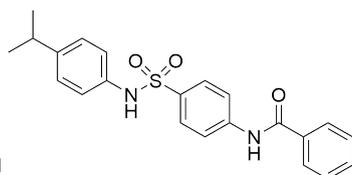
PP-03-125
Schl-38-048



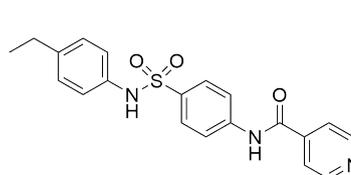
PP-03-067
Schl-38-051



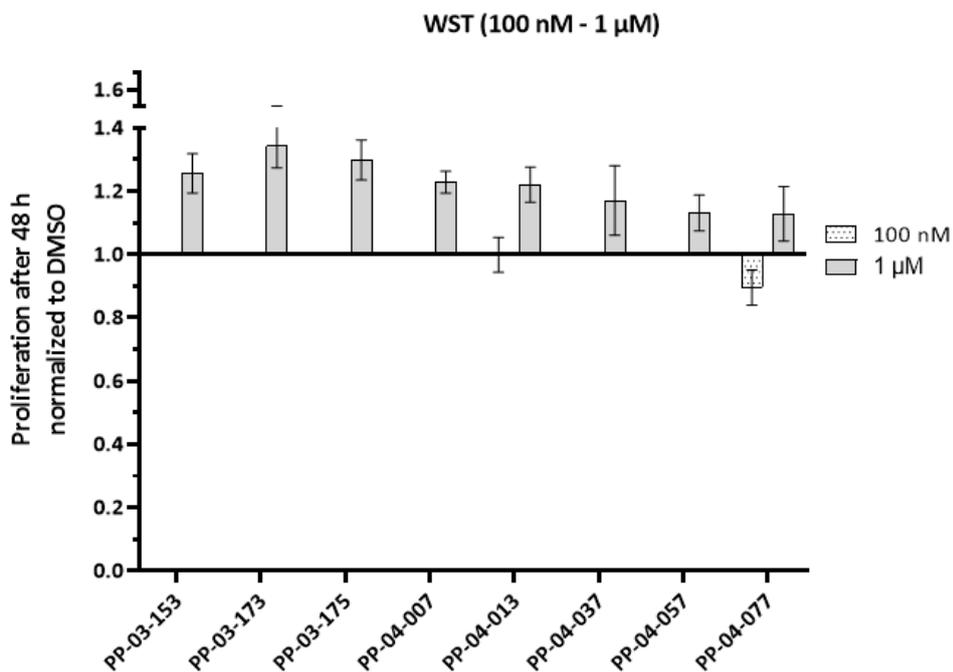
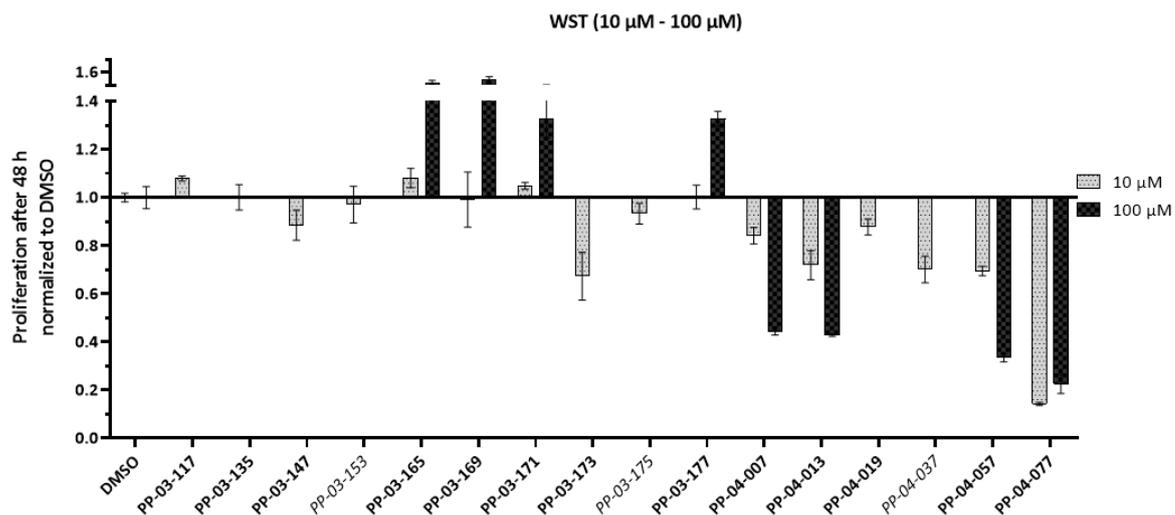
PP-03-079
Schl-38-055

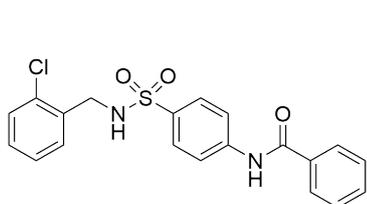


PP-03-139
Schl-38-054

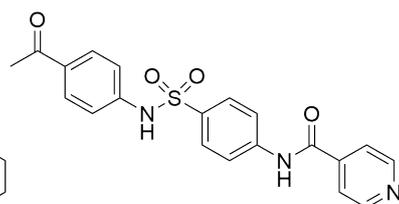


PP-03-069
Schl-38-053

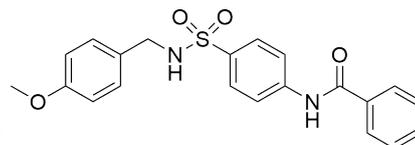




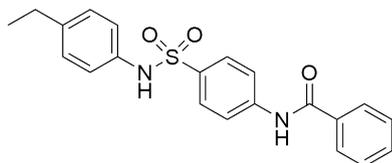
PP-03-117
Schl-38-030



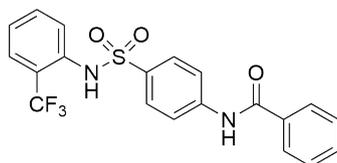
PP-04-013
Schl-38-057



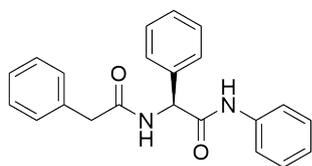
PP-03-147
Schl-38-038



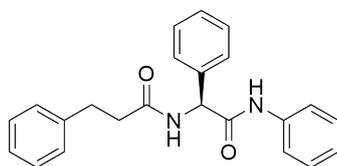
PP-03-135
Schl-38-052



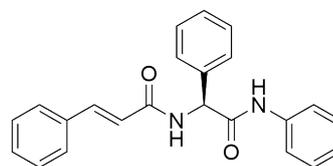
PP-04-019
Schl-38-050



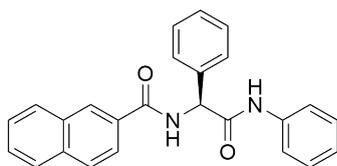
PP-03-177
Schl-38-093



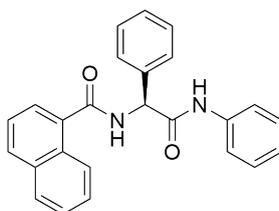
PP-03-165
Schl-38-094



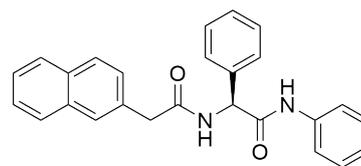
PP-03-153
Schl-38-095



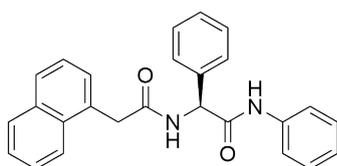
PP-03-169
Schl-38-097



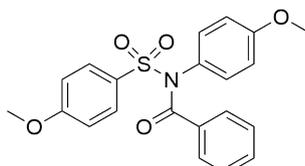
PP-03-171
Schl-38-098



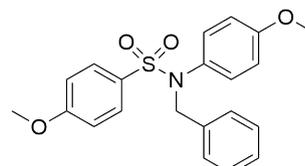
PP-03-173
Schl-38-099



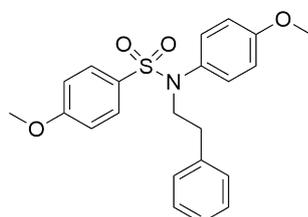
PP-03-175
Schl-38-100



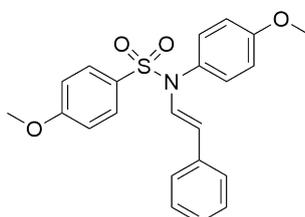
PP-04-007
Schl-38-058



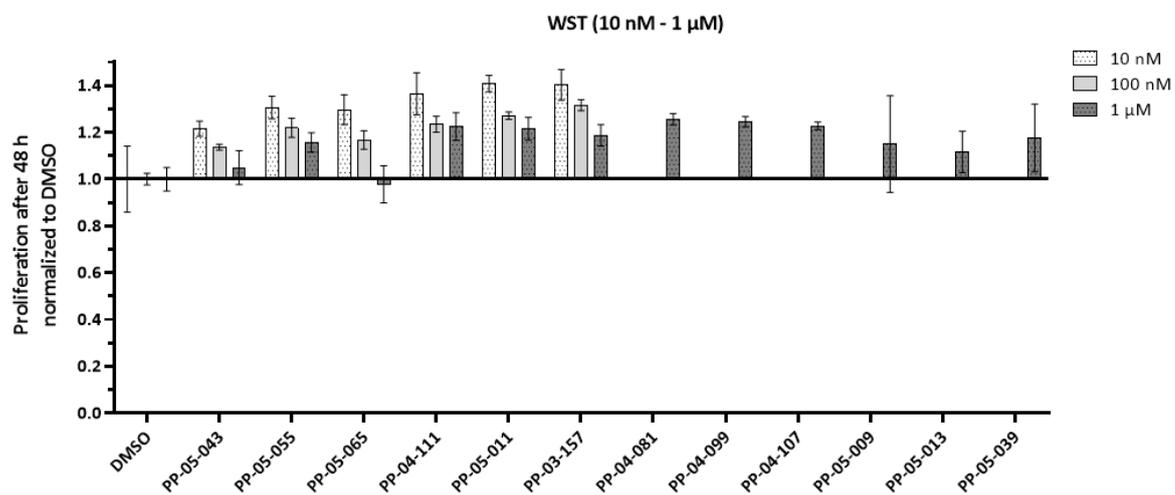
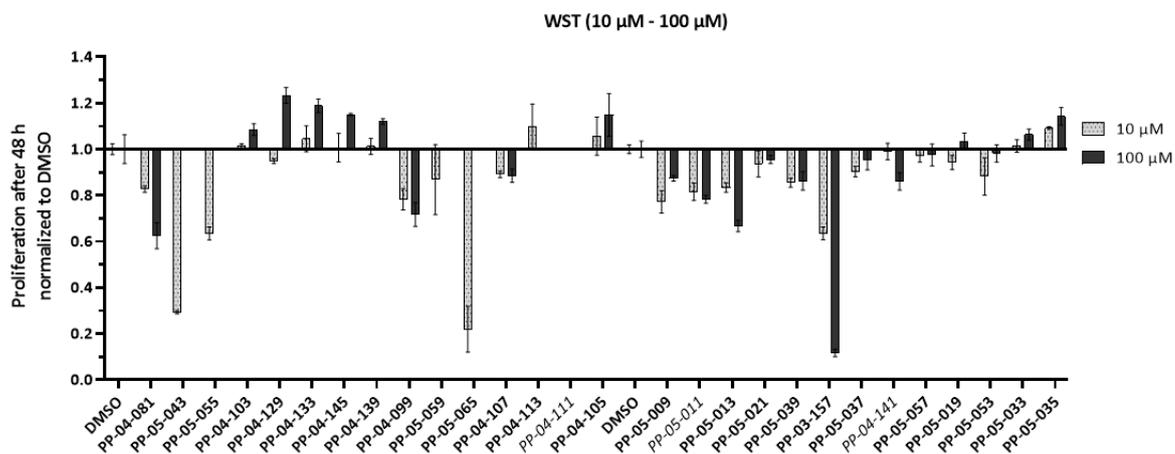
PP-04-037
Schl-38-059

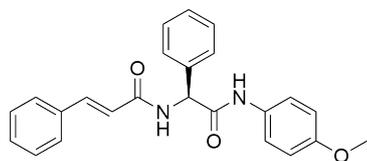


PP-04-057
Schl-38-060

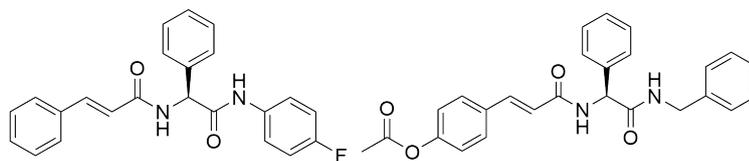


PP-04-077
Schl-38-061

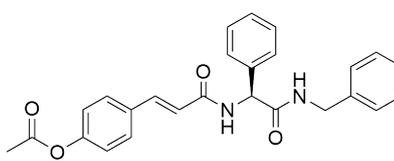




PP-05-043
Schl-38-153



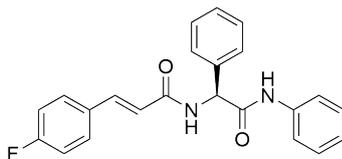
PP-05-059
Schl-38-155



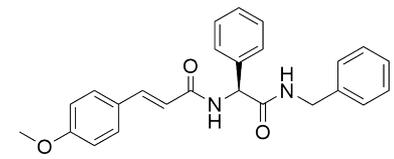
PP-04-129
Schl-38-162



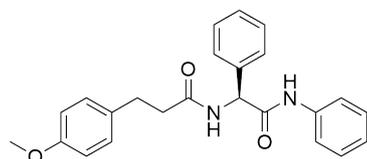
PP-05-065
Schl-38-148



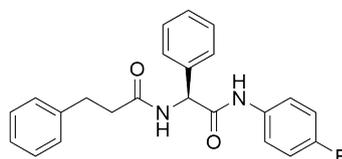
PP-05-055
Schl-38-149



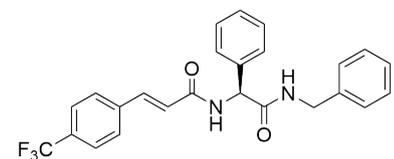
PP-04-133
Schl-38-161



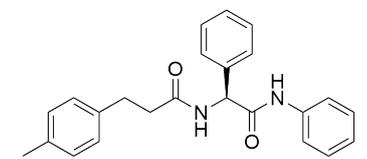
PP-05-019
Schl-38-135



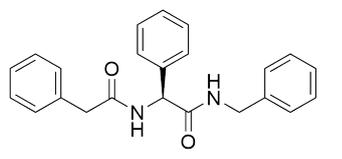
PP-05-057
Schl-38-142



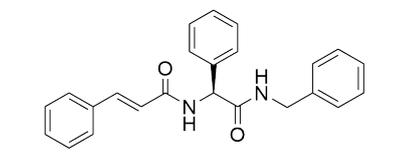
PP-04-145
Schl-38-163



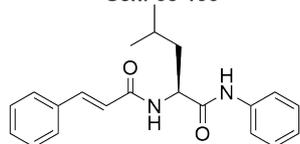
PP-05-021
Schl-38-136



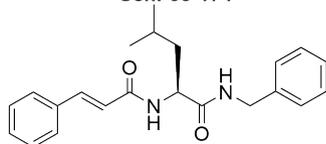
PP-05-039
Schl-38-174



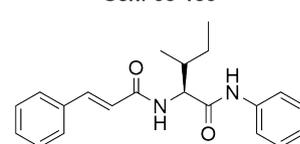
PP-04-103
Schl-38-185



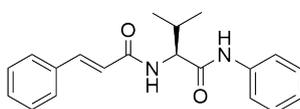
PP-04-107
Schl-38-171



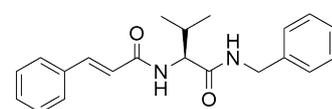
PP-04-113
Schl-38-183



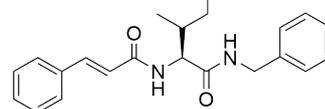
PP-04-141
Schl-38-172



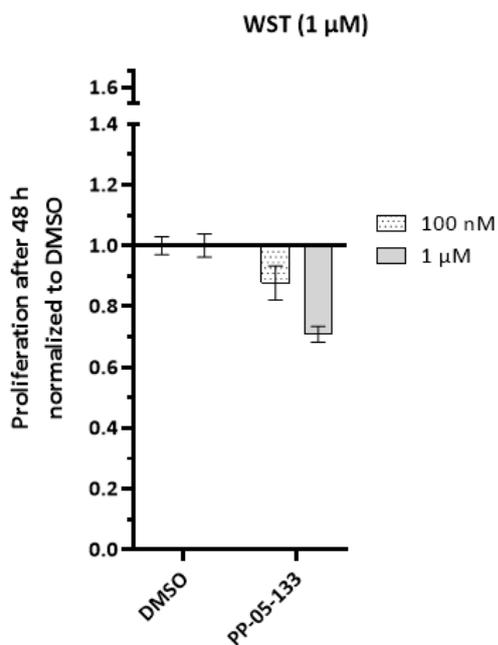
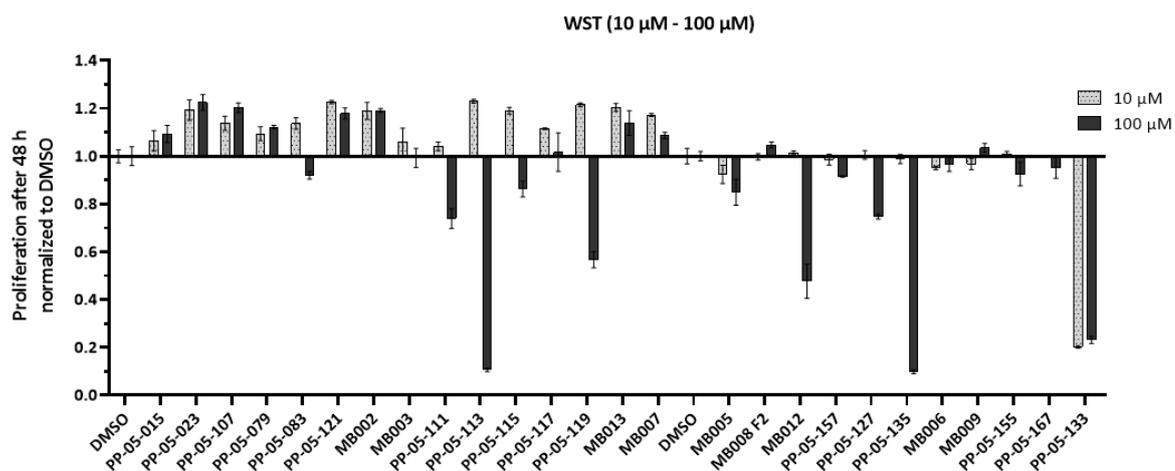
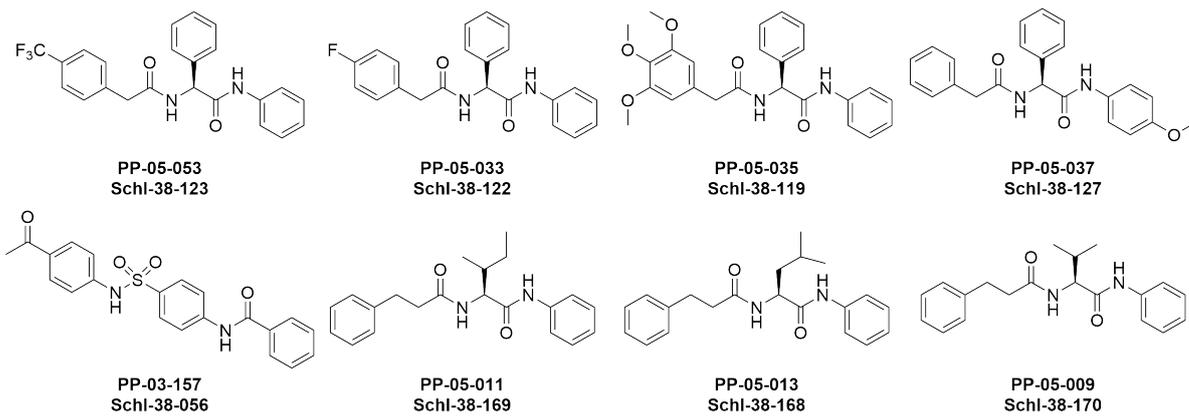
PP-04-111
Schl-38-173

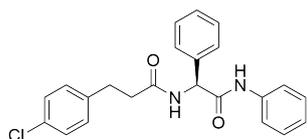


PP-04-105
Schl-38-185

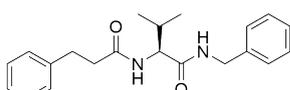


PP-04-139
Schl-38-184

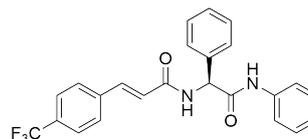




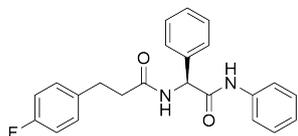
PP-05-015
Schl-38-139



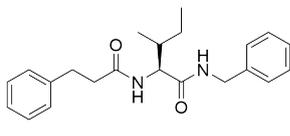
PP-05-111
Schl-38-182



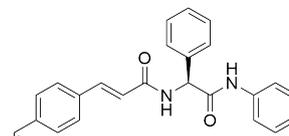
PP-05-079
Schl-38-150



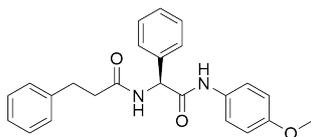
PP-05-023
Schl-38-137



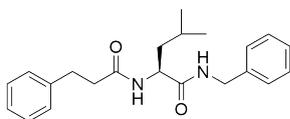
PP-05-113
Schl-38-181



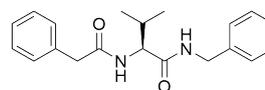
PP-05-083
Schl-38-152



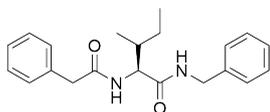
PP-05-107
Schl-38-140



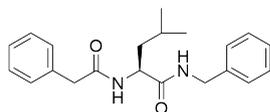
PP-05-115
Schl-38-180



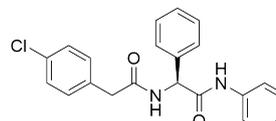
PP-05-117
Schl-38-179



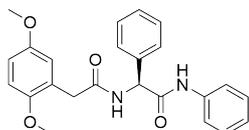
PP-05-119
Schl-38-178



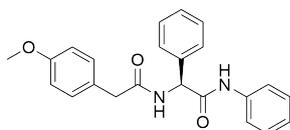
PP-05-121
Schl-38-177



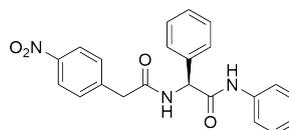
MB002
Schl-38-125



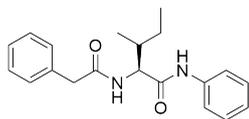
MB013
Schl-38-117



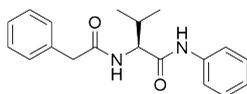
MB003
Schl-38-115



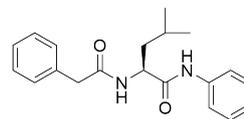
MB008 F2
Schl-38-124



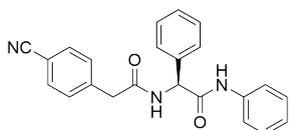
MB005
Schl-38-166



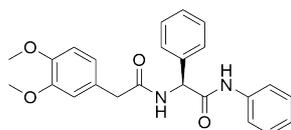
MB006
Schl-38-167



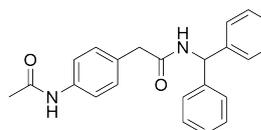
MB007
Schl-38-165



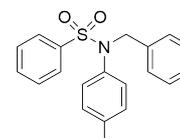
MB009
Schl-38-126



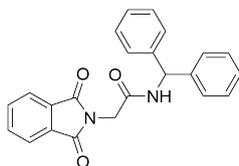
MB012
Schl-38-116



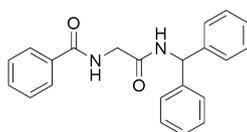
PP-05-167
Schl-38-091



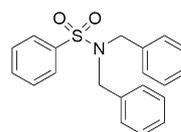
PP-05-133
Schl-38-064



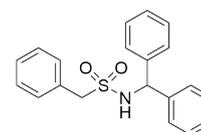
PP-05-155
Schl-38-089



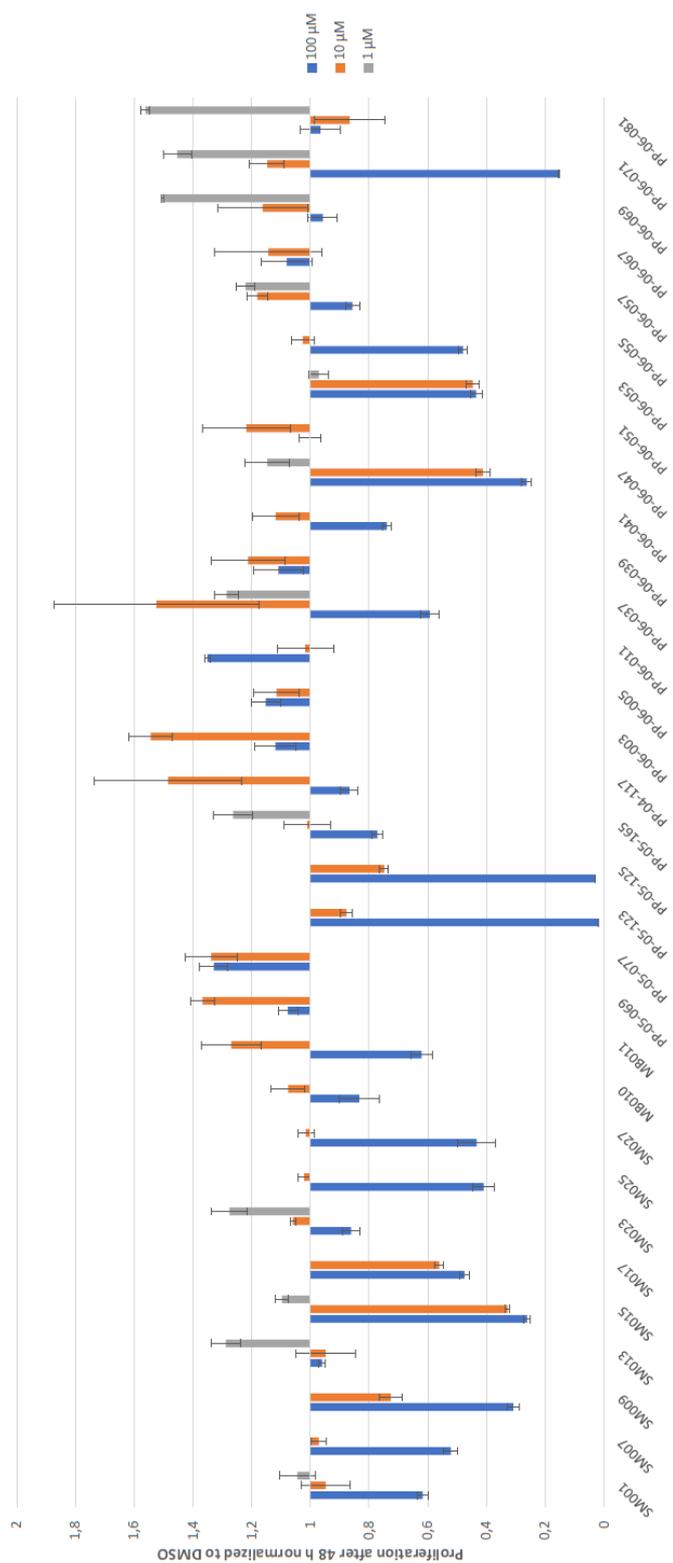
PP-05-157
Schl-38-090

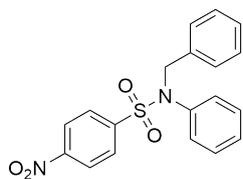


PP-05-127
Schl-38-062

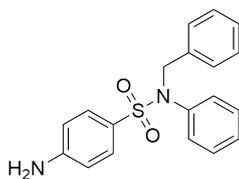


PP-05-135
Schl-38-065

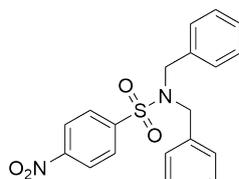




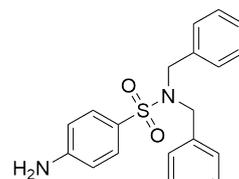
SM001
Schl-38-066



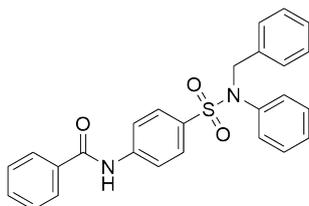
SM007
Schl-38-067



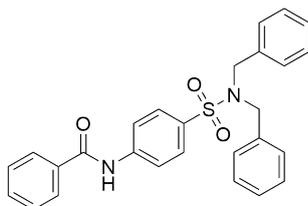
SM023
Schl-38-070



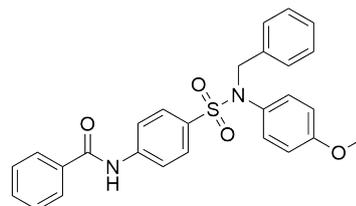
SM025
Schl-38-071



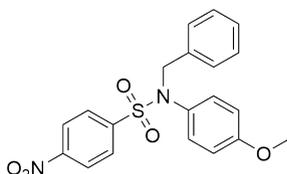
SM009
Schl-38-072



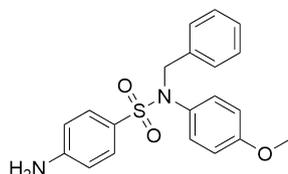
SM027
Schl-38-075



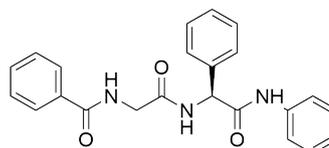
SM017
Schl-38-073



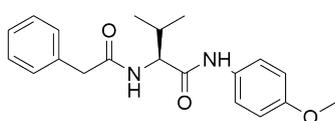
SM013
Schl-38-068



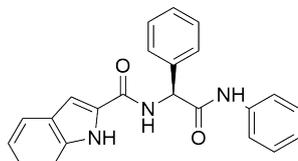
SM015
Schl-38-069



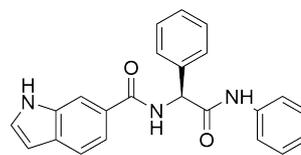
PP-05-077
Schl-38-101



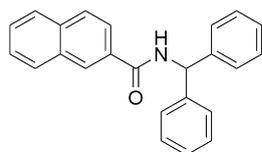
PP-05-069
Schl-38-129



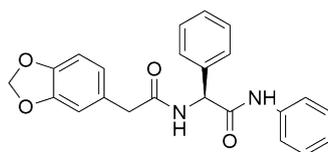
PP-05-123
Schl-38-102



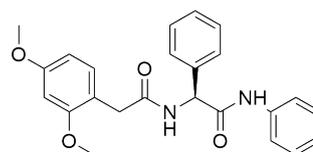
PP-05-125
Schl-38-103



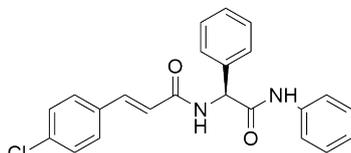
PP-05-165
Schl-38-086



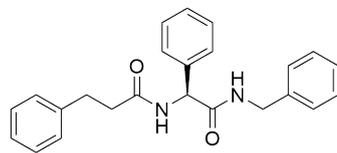
MB011
Schl-38-120



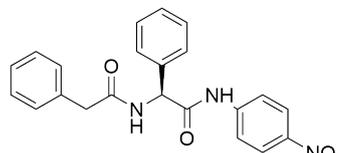
MB010
Schl-38-118



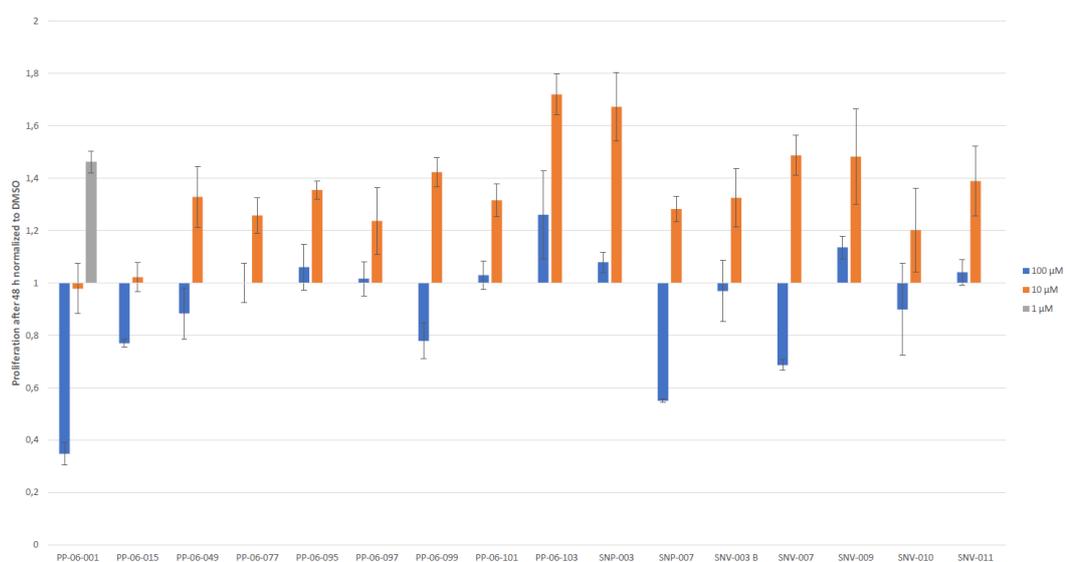
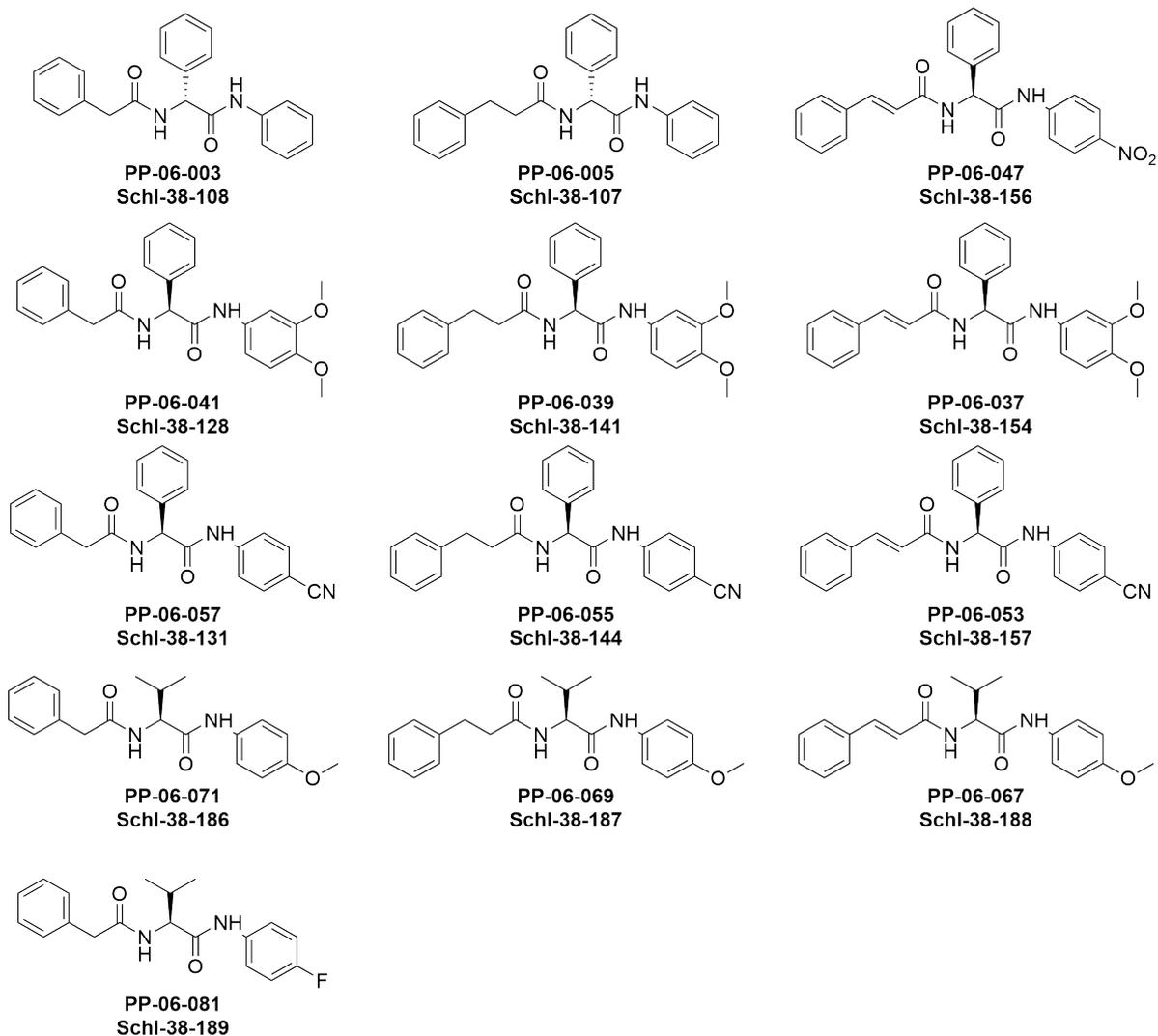
PP-04-117A
Schl-38-152

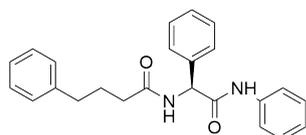


PP-06-011
Schl-38-175

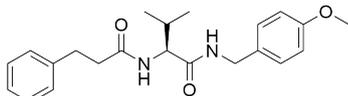


PP-06-051
Schl-38-130

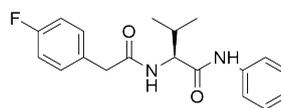




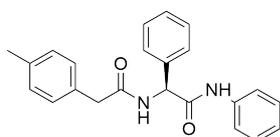
PP-06-001
Schl-38-096



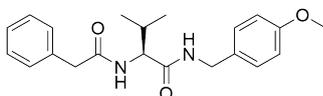
PP-06-095
Schl-38-193



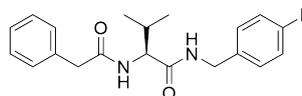
SNV007
Schl-38-204



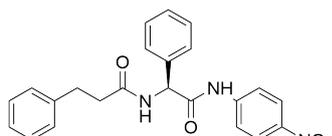
PP-06-015
Schl-38-121



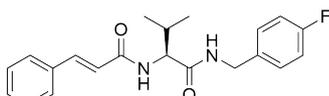
PP-06-097
Schl-38-192



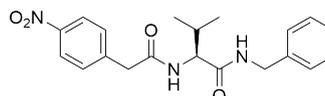
PP-06-103
Schl-38-195



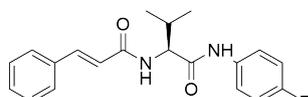
PP-06-049
Schl-38-143



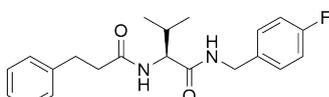
PP-06-099
Schl-38-197



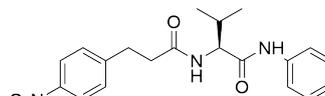
SNV010
Schl-38-207



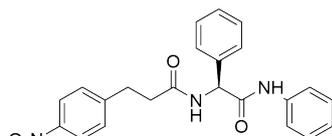
PP-06-077
Schl-38-191



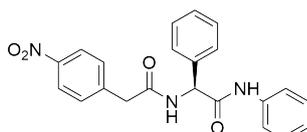
PP-06-101
Schl-38-196



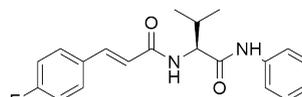
SNV011
Schl-38-208



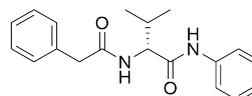
SNP007
Schl-38-138



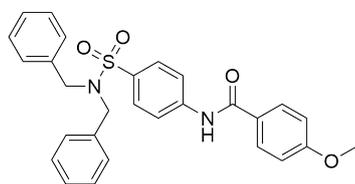
SNP003
Schl-38-124



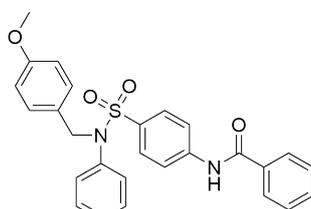
SNV009
Schl-38-206



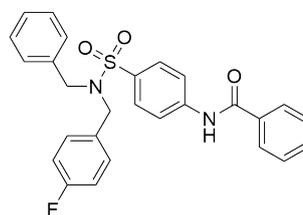
SNV003B



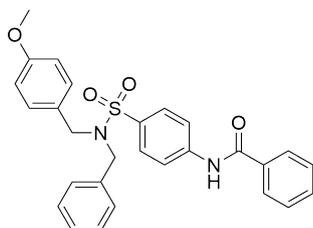
NP019
Schl-38-077



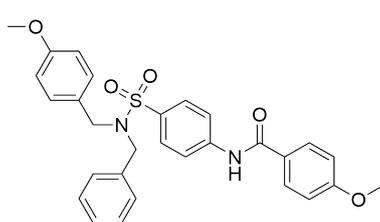
JG014
Schl-38-074



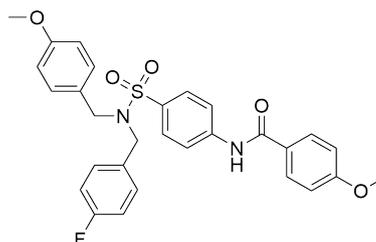
PP-07-055
Schl-38-078



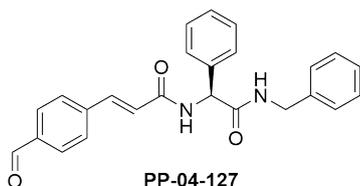
JG030
Schl-38-076



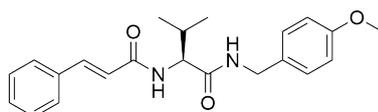
JG031
Schl-38-080



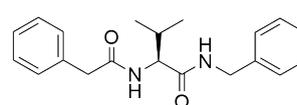
JG020
Schl-38-081



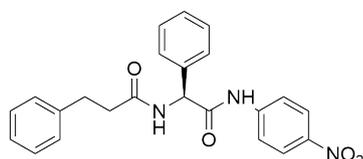
PP-04-127
Schl-38-164



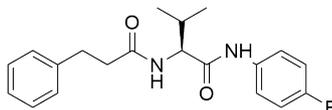
PP-06-093
Schl-38-194



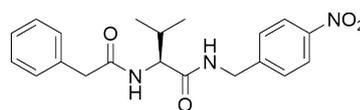
PP-06-013
Schl-38-180



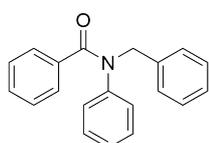
PP-06-049
Schl-38-143



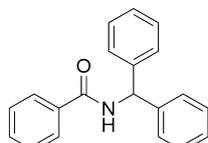
PP-06-079
Schl-38-190



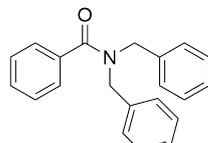
PP-06-143
Schl-38-198



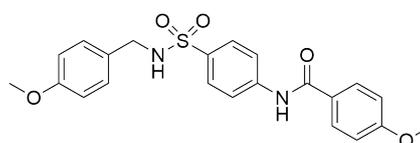
PP-06-137
Schl-38-082



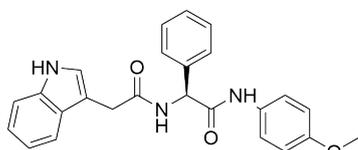
PP-06-139
Schl-38-084



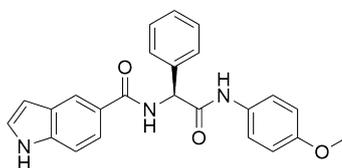
PP-06-141
Schl-38-083



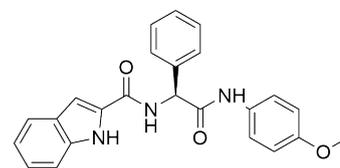
NP001 End
Schl-38-213



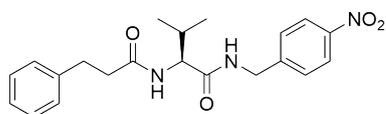
PP-06-151
Schl-38-106



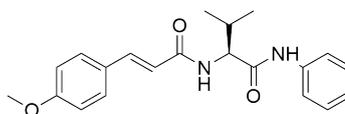
PP-06-153
Schl-38-104



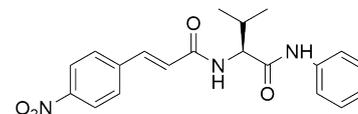
PP-06-149
Schl-38-105



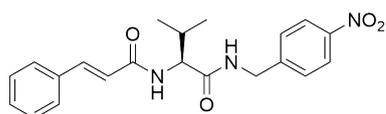
PP-06-145
Schl-38-199



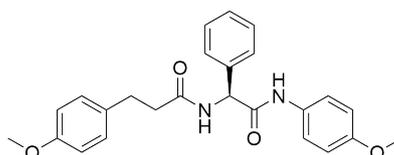
SNV05
Schl-38-203



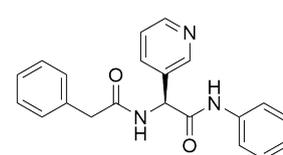
PP-06-129/SNV06a
Schl-38-209



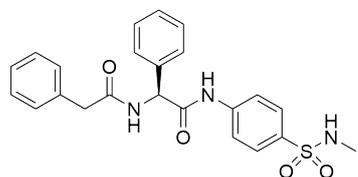
PP-06-147
Schl-38-200



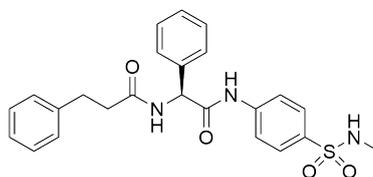
SM069
Schl-38-147



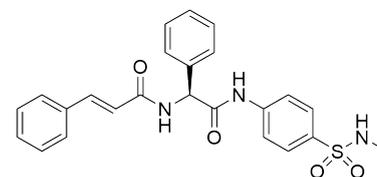
PP-07-081
Schl-38-210



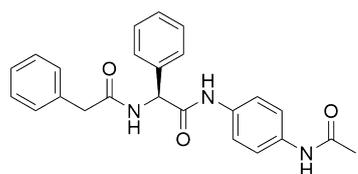
PP-06-159
Schl-38-132



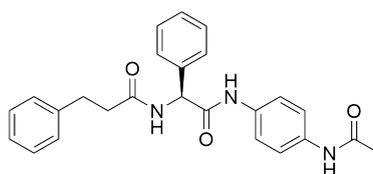
PP-06-161
Schl-38-145



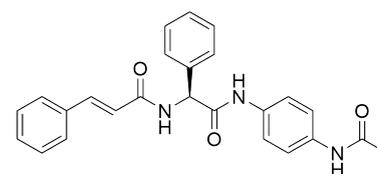
PP-06-163
Schl-38-158



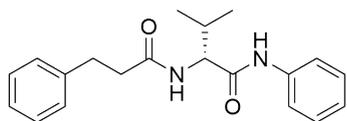
PP-07-005/PP-07-021
Schl-38-133



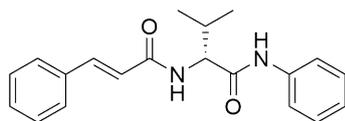
PP-07-003
Schl-38-146



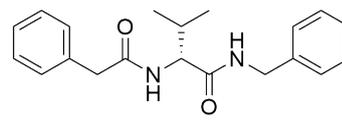
PP-07-001
Schl-38-159



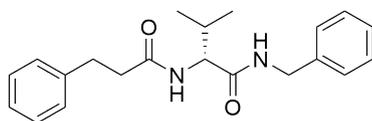
PP-07-061
Schl-38-110



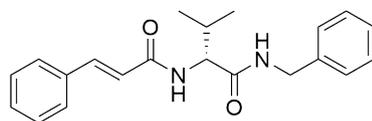
PP-07-063
Schl-38-111



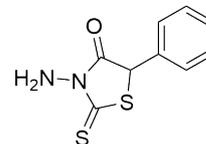
PP-07-067
Schl-38-112



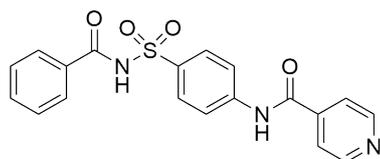
PP-07-069
Schl-38-113



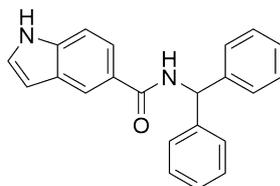
PP-07-071
Schl-38-114



PP-02-007
Schl-38-027



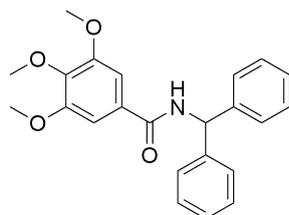
PP-02-163
Schl-38-028



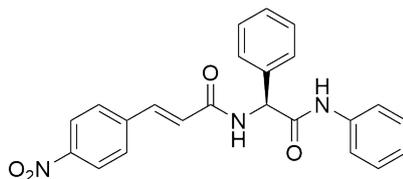
PP-05-161
Schl-38-087



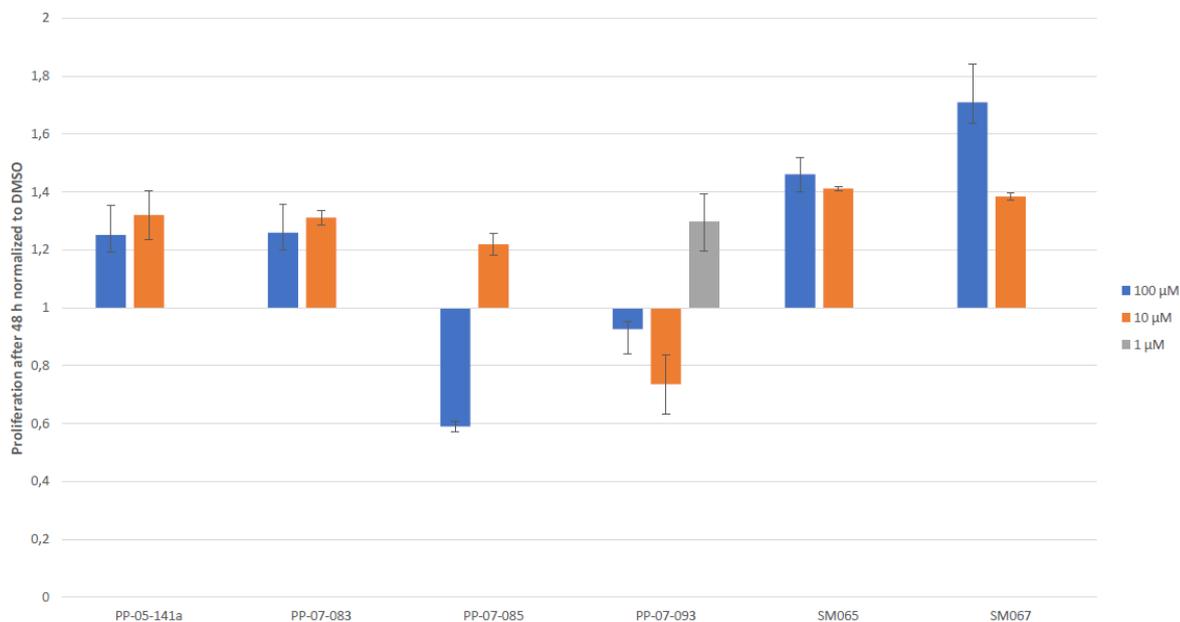
PP-05-159
Schl-38-088

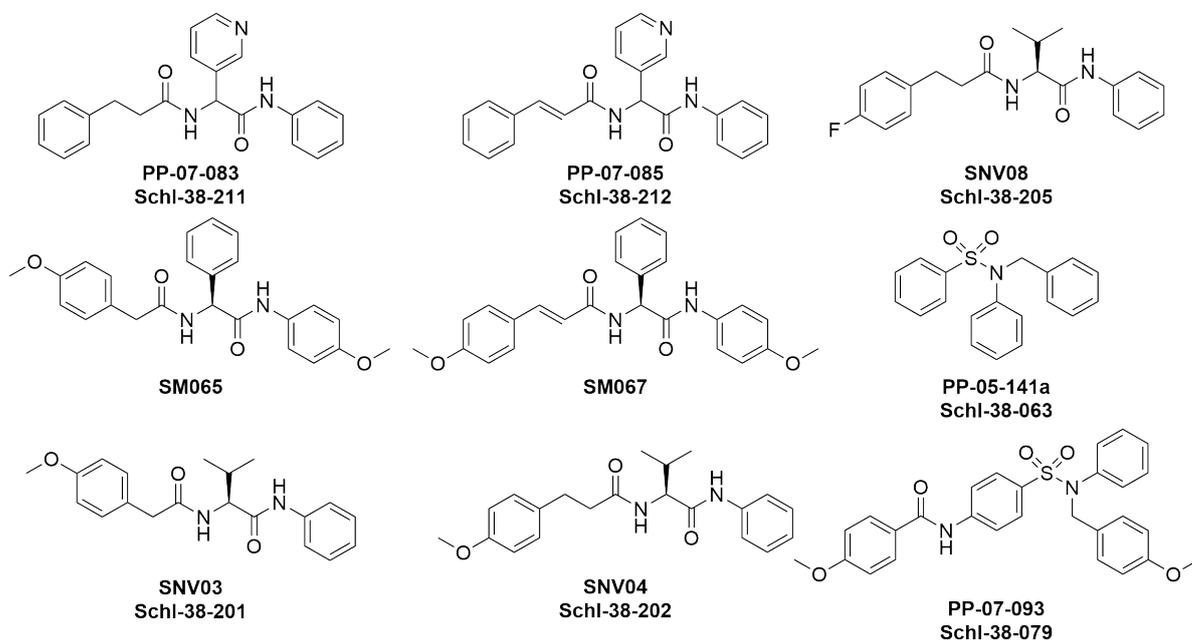
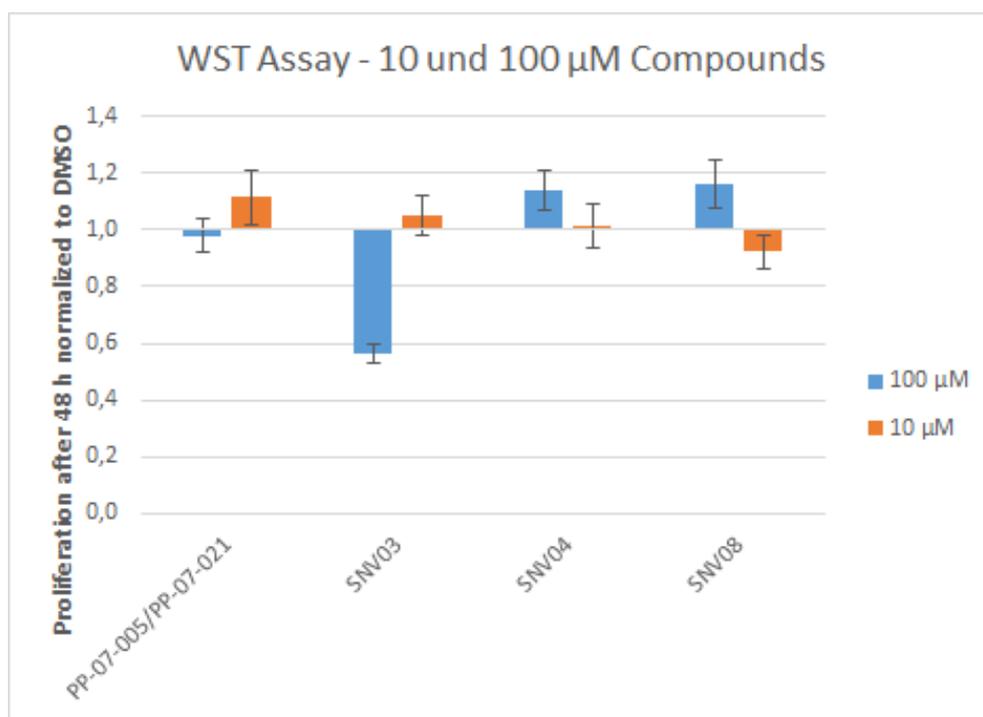


PP-05-163
Schl-38-085



PP-06-131/SNP04a/PP-05-085
Schl-38-151





8.3 Erläuterungen zu den Angaben im Anhang zu den biologischen Testergebnissen gegen *Schistosoma mansoni*

Wirksamkeit

Unter Wirksamkeit ist eine Aktivität gegenüber den *Schistosoma mansoni* zu verstehen. Darüber hinaus wurde die Aktivität wie folgt genauer definiert:

L (lethal):	Letaler Effekt für die Schistosomen
T (tegumental damage):	Tegumentschäden
O (damage of organs):	Organschäden
P (decreased pairing stability):	Reduktion der Paarungsstabilität
E (decreased egg number production):	Reduktion der Eiproduktion

Paare/Männchen/Weibchen angesaugt/nicht angesaugt

Anzahl der nach 24 h, 48 h und 72 h vorhandenen gepaarten Wurmpaare/Männchen/Weibchen. Es wurde zwischen den an der Petrischale angesaugten und nicht angesaugten Paaren/Männchen/Weibchen unterschieden. Je größer die Zahl der gepaarten Wurmpaare/Männchen/Weibchen war, desto weniger aktiv waren die getesteten Verbindungen.

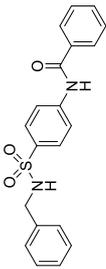
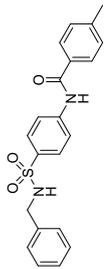
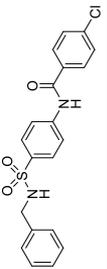
Eizahlen

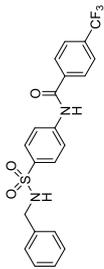
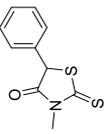
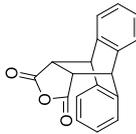
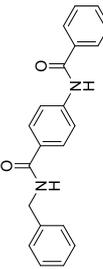
Absolute Eizahlen an gelegten Schistosomeneiern nach 24 h, 48 h und 72 h. Die Eizahlen waren auf DMSO als Negativ-Kontrolle normiert, um so eine Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Testreihen für alle getesteten Verbindungen zu gewährleisten.

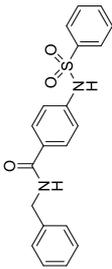
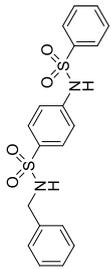
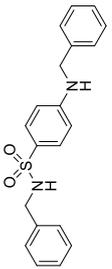
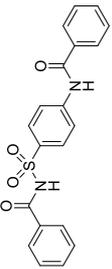
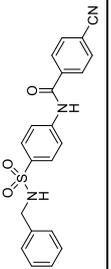
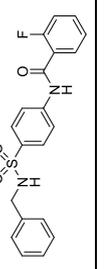
Phänotypen

Unter diesem Punkt wurden die Phänotypen und weitere Beobachtungen aufgelistet.

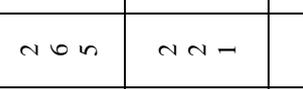
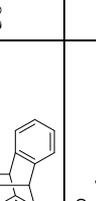
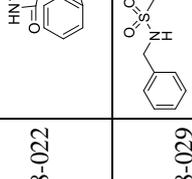
Ergebnisse der biologischen Testungen auf *Schistosoma mansoni*

Verbindung	Struktur	Konzentration	Wirksamkeit	Paare		Männchen		Weibchen		Eierzahl (24h, 48h, 72h)	Eierzahl normiert auf DMSO (24h, 48h, 72h) in %	Phänotypen nach 72 h
				Ange saugt	Nicht angesaugt	Ange saugt	Nicht angesaugt	Ange saugt	Nicht angesaugt			
Schl-35-061		50 µM (1)	A ^{OPE}	0 0 0	9 5 1	0 0 0	1 5 9	0 0 0	1 5 9	61 14 16	45 8 8	- leichte Darmdilatation bei 7 Weibchen - Substanz fällt aus
		50 µM (2)	A ^{PE}	0 0 0	4 0 0	0 0 0	6 10 10	0 0 0	6 10 10	7 18 4	5 9 1	- Substanz fällt stark aus
		25 µM (1)	A ^{OPE}	1 0 0	4 0 0	1 0 0	4 10 10	0 0 0	5 10 10	8 5 0	6 3 0	- Substanz fällt weniger stark aus - Darmdilatation bei 3 Männchen und 4 Weibchen
Schl-38-001		50 µM	-	2 6 3	8 4 5	0 0 0	0 0 2	0 0 0	0 0 2	68 100 62	50 55 30	- ein Paar fast entpaart
Schl-38-002		50 µM	-	10 8 8	0 1 1	0 1 0	0 0 1	0 0 0	0 1 1	64 157 207	47 87 99	- zwei Pärchen fast entpaart

Verbindung	Struktur	Konzentration	Wirksamkeit	Paare		Männchen		Weibchen		Eierzahl (24h, 48h, 72h)	Eierzahl normiert auf DMSO (24h, 48h, 72h) in %	Phänotypen nach 72 h
				Ange saugt	Nicht angesaugt	Ange saugt	Nicht angesaugt	Ange saugt	Nicht angesaugt			
Schl-38-009		50 µM	A ^{OPE}	9 3 3	0 2 0	1 3 2	0 2 5	0 0 0	1 5 7	92 65 7	68 36 3	- Darmdilataion bei allen Weibchen
		50 µM (2)	A ^{OPE}	10 5 1	0 0 0	0 5 7	0 0 2	0 0 0	0 5 9	32 15 7	25 8 2	- Darmdilataion bei 7 Weibchen
		25 µM (1)	A ^{OPE}	7 4 0	1 0 0	2 6 6	0 0 4	1 0 0	1 6 10	18 3 0	13 2 0	- Darmdilataion bei allen Weibchen
Schl-38-016		50 µM	-	9 9 7	0 0 2	1 1 0	0 0 1	1 0 0	0 1 1	268 356 98	199 197 47	- ein Paar falsch herum
Schl-38-021		50 µM	-	10 9 10	0 1 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	146 410 502	108 227 239	keine
Schl-38-003		50 µM	-	2 3 0	5 4 7	1 2 0	2 1 3	0 0 0	3 3 3	73 71 97	54 39 46	keine

Verbindung	Struktur	Konzentration	Wirksamkeit	Paare		Männchen		Weibchen		Eierzahl (24h, 48h, 72h)	Eierzahl normiert auf DMSO (24h, 48h, 72h) in %	Phänotypen nach 72 h
				Ange saugt	Nicht angesaugt	Ange saugt	Nicht angesaugt	Ange saugt	Nicht angesaugt			
Schl-38-007		50 µM	-	6 2 3	4 8 7	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	15 56 42	11 31 20	- ein Pärchen hyperaktiv - Weibchen leichte Darmdilatation
Schl-38-010		50 µM	-	10 1 9	0 9 1	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	640 485 337	474 268 160	- ein Paar spastische Zuckungen
Schl-38-011		50 µM	-	0 0 0	1 0 0	0 0 0	9 10 7	0 0 0	9 10 7	68 91 92	28 50 44	keine
Schl-38-017		50 µM	-	9 8 9	0 1 0	0 1 1	0 0 0	1 0 0	1 0 0	160 389 306	119 215 146	keine
Schl-38-004		50 µM	-	3 2 1	6 0 0	0 1 1	0 1 1	1 5 8	1 2 0	14 66 12	11 34 4	-Substanz fällt wenig aus - Pilzbefall
Schl-38-006		50 µM	-	4 1 1	4 0 1	1 2 1	1 2 1	1 7 7	2 0 0	6 18 0	5 9 0	- Substanz fällt stark aus

Verbindung	Struktur	Konzentration	Wirksamkeit	Paare		Männchen		Weibchen		Eierzahl (24h, 48h, 72h)	Eierzahl normiert auf DMSO (24h, 48h, 72h) in %	Phänotypen nach 72 h
				Ange saugt	Nicht angesaugt	Ange saugt	Nicht angesaugt	Ange saugt	Nicht angesaugt			
Schl-38-008		50 µM	-	2	4	0	4	0	4	10	8	
Schl-38-014		50 µM	-	1	2	0	1	0	4	16	12	- ein Paar falsch herum
Schl-38-024		50 µM	-	6	0	4	0	4	0	51	40	
Schl-38-026		50 µM	-	9	1	0	0	0	0	64	50	
Schl-38-028		50 µM	-	9	0	0	0	0	0	155	79	keine
Schl-38-012		50 µM	-	5	4	0	1	0	1	130	100	
				4	3	1	2	0	3	172	88	
				3	3	0	4	0	4	347	115	keine
												- Substanz fällt stark aus

Verbindung	Struktur	Konzentration	Wirksamkeit	Paare		Männchen		Weibchen		Eierzahl (24h, 48h, 72h)	Eierzahl normiert auf DMSO (24h, 48h, 72h) in %	Phänotypen nach 72 h
				Ange saugt	Nicht angesaugt	Ange saugt	Nicht angesaugt	Ange saugt	Nicht angesaugt			
Schl-38-013		50 µM	-	7	1	2	0	0	0	66	51	-Pilzbefall
Schl-38-018		50 µM	-	4	1	2	3	1	4	17	13	keine
Schl-38-022		50 µM	-	8	2	0	0	0	0	94	73	keine
Schl-38-029		50 µM	-	1	4	2	3	0	5	2	18	-Substanz fällt aus