

Über die Hemmung des Flavivirins

**Makrocyclische Peptidderivate als Inhibitoren der NS2B-NS3-Protease
des Zika-Virus und des West-Nil-Virus**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Niklas Josua Braun

aus Nürnberg

Marburg 2022

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden zwischen März 2019 und Juli 2022 auf Anregung von Herrn Prof. Dr. Torsten Steinmetzer am Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

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

Zweitgutachterin: **Prof. Dr. Wibke Diederich**

Drittgutachter: **Prof. Dr. Eberhard Hildt**

Eingereicht am **1. November 2022**

Tag der mündlichen Prüfung: **16. Dezember 2022**

Hochschulkennziffer: 1180

Inhalt

Hinweise zur Nomenklatur, zur Nummerierung und zur Darstellung	vi
1 Einführung.....	1
1.1 Flaviviren	1
1.1.1 Allgemeines, Verbreitung, Übertragung, Krankheitsbild.....	1
1.1.2 Der Aufbau flaviviraler Virionen.....	3
1.1.3 Der flavivirale Replikationszyklus.....	5
1.1.4 Prävention und Therapie	8
1.2 Die flavivirale Protease (Flavivirin).....	9
1.2.1 Die Struktur des Flavivirins	9
1.2.2 Inhibitoren des Flavivirins	15
1.2.2.1 Kompetitive Inhibitoren: Peptide und Peptidderivate	15
1.2.2.2 Niedermolekulare kompetitive Inhibitoren	29
1.2.2.3 Allosterische Inhibitoren	31
2 Ausgangsbedingungen und Zielsetzung.....	35
2.1 Hinweise zur Nomenklatur und zur Darstellung cyclischer Inhibitoren	35
2.2 Ausgangsbedingungen	36
2.3 Zielsetzung	41
3 Ergebnisse und Diskussion.....	45
3.1 Identifizierung und Charakterisierung der Leitstruktur.....	45
3.1.1 Charakterisierung vorhandener Verbindungen und erster neuer Inhibitoren	45
3.1.2 Enzymkinetische Charakterisierung der Leitstruktur.....	48
3.1.3 Lineare Referenzverbindungen	54
3.2 Einzelmodifikationen der Leitstruktur	57
3.2.1 Po-Modifikationen.....	57
3.2.2 P4-Modifikationen	62
3.2.2.1 Derivate des Inhibitors 42 mit linearem Linkersegment	62
3.2.2.2 Derivate der Inhibitoren C-14 , C-15 und C-16	65
3.2.2.3 Linkersegmente ohne P4-Rest.....	75

3.2.3	P3-Modifikationen.....	75
3.2.4	P2-Modifikationen.....	80
3.2.5	P1-Modifikationen.....	84
3.3	Kombinierte Derivate	86
3.3.1	P ω -modifizierte Derivate des Inhibitors C-14	86
3.3.2	Lipophile Kombinationen.....	87
3.3.3	Analoga zellpenetrierender Peptide	99
3.4	Methylierungen des Inhibitorrückgrats.....	104
3.5	Hemmung der Proproteinkonvertase Furin	106
3.6	Selektivitätsuntersuchung mit Faktor Xa, Thrombin und Trypsin	107
3.7	Untersuchungen <i>in cellulo</i>	109
3.8	Boroleucin-basierte Inhibitoren	116
3.9	Synthese der Inhibitoren.....	122
3.9.1	Synthese der Leitstruktur 42	122
3.9.2	Synthese linkermodifizierter Inhibitoren	125
3.9.3	Synthese P3- oder P2-modifizierter Inhibitoren	130
3.9.4	Synthese P1-modifizierter Inhibitoren.....	135
3.9.5	Synthese P ω -modifizierter Derivate des Inhibitors C-14	137
3.9.6	Synthese kombinierter Derivate mit erhöhter Lipophilie	137
3.9.7	Synthese potentiell zellpenetrierender Inhibitoren	138
3.9.8	Synthese linearer Referenzverbindungen	140
3.9.9	Synthese Boroleucin-basierter Inhibitoren	142
4	Zusammenfassung	147
5	Material und Methoden	153
5.1	Allgemeines.....	153
5.2	Enzymkinetische Messungen	155
5.3	Synthesevorschriften	163
5.3.1	Synthesen von Bausteinen für die Festphasenpeptidsynthese	163
5.3.2	Synthese der linkermodifizierten Inhibitoren C-1 bis C-49	165

5.3.3	Synthese der P3- bzw. P2-modifizierten Inhibitoren C-50 bis C-90	169
5.3.4	Synthese der P1-modifizierten Inhibitoren C-91 bis C-98	174
5.3.5	Synthese der kombinierten Inhibitoren C-99 bis C-128	177
5.3.6	Synthese der Boroleucin-basierten Inhibitoren B-1 bis B-8	182
5.3.7	Synthese der linearen Referenzinhibitoren L-1 bis L-6	185
6	Literaturverzeichnis.....	189
7	Anhang.....	I
7.1	Summary in English.....	I
7.2	Publikationen und Konferenzbeiträge.....	III
7.3	Abbildungen.....	IV
7.4	Tabellen.....	VI
7.5	Schemata	VII
7.6	Abkürzungen.....	VIII
7.7	Inhibitoren nach Nummer	X
7.8	Inhibitoren nach MI-Nummer	XIII
7.9	Tabellarischer Lebenslauf	XVI
7.10	Danksagung.....	XVII
7.11	Eidesstattliche Erklärung.....	XVIII

Hinweise zur Nomenklatur, zur Nummerierung und zur Darstellung

Nomenklatur viraler Proteasen. Die Bezeichnung „Flavivirin“ für die flavivirale NS2B-NS3-Protease wird in dieser Arbeit immer dann verwendet, wenn diese Protease im Allgemeinen, d.h. unabhängig von der Spezies, gemeint ist. Die Protease bestimmter Virusspezies wird dagegen immer als XYV-Protease bezeichnet, wobei „XYV“ für die Virusabkürzung laut Abkürzungsverzeichnis steht (es ergeben sich also ZIKV-Protease, YFV-Protease usw.).

Nomenklatur von Aminosäureresten und Aminosäurepositionen. In dieser Arbeit wird zur Bezeichnung der Position von Aminosäureresten in Substraten die Nomenklatur nach SCHECHTER und BERGER¹ benutzt: Reste *N*-terminal der proteolytischen Schnittstelle werden mit steigendem Abstand zur Schnittstelle als P1-Rest, P2-Rest, P3-Rest usw. bezeichnet, Reste *C*-terminal der Schnittstelle als P1'-Rest, P2'-Rest, P3'-Rest usw. Die Bindestellen im Enzym werden analog als S1-, S2- oder S3-Tasche bzw. S1'-, S2'- oder S3'-Tasche bezeichnet. Korrekterweise sollte immer von Aminosäureresten gesprochen werden. Im Rahmen dieser Arbeit werden Aminosäurereste dennoch häufig nach der eingebauten Aminosäure benannt; so wird z.B. ein Glycinrest als Glycin bezeichnet. Diese chemisch nicht korrekte Vereinfachung dient der verbesserten Lesbarkeit dieser Arbeit. Des Weiteren wurde im Fließtext weitgehend auf Abkürzungen von Aminosäureresten verzichtet, was ebenfalls der verbesserten Lesbarkeit dient. Ausgenommen hiervon sind die Reste des Flavivirins, die im Einbuchstabencode und mit zugehörigen Positionen angegeben werden: Zur Unterscheidung zwischen NS2B- und NS3-Resten werden NS2B-Reste zusätzlich mit „*“ markiert. NS3-Reste werden also beispielsweise als H51, D75, S135 usw. abgekürzt, NS2B-Reste beispielsweise als D75* oder D83*. Aminosäurereste werden gemäß den Empfehlungen der *IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN)* mit einem oder drei Buchstaben abgekürzt.² Zur besseren Unterscheidbarkeit werden die Reste des Flavivirins mit dem Einbuchstabencode abgekürzt, die Reste von Liganden bzw. Substraten und Inhibitoren in der Regel mit dem Dreibuchstabencode.

Nomenklatur von Aminosäurepositionen in Inhibitoren. Die Nomenklatur nach SCHECHTER und BERGER¹ wird in dieser Arbeit auch zur Nummerierung von Resten peptidischer Inhibitoren verwendet, obwohl diese in der Regel keine Schnittstelle besitzen. In diesem Falle wird derjenige Rest als „P1-Rest“ bezeichnet, der nachweislich oder mutmaßlich die S1-Tasche besetzt, als „P2-Rest“ derjenige Rest, der die S2-Tasche besetzt usw.; typischerweise werden auf diese Art nur α -Aminosäurereste benannt, in dieser Arbeit werden auch β -Aminosäurereste oder längere Reste nach dieser Nomenklatur bezeichnet.

Darstellung von Kristallstrukturen. In Darstellungen von Komplexkristallstrukturen sind der Ligand, das Enzym und der PDB-Zugangscode in der Regel in der Abbildung selbst angegeben. Wenn nicht anders in der Abbildungsbeschreibung erläutert, so gilt Folgendes: Oberflächen von Proteinen sind immer als *Conolly-Surface (solvent-excluded surface)* dargestellt. Wasserstoffatome wurden für die Berechnung dieser Oberflächen berücksichtigt. Die Oberfläche der NS2B-Kette ist in Rosa gezeigt, die

Oberfläche der NS3-Kette in Grau. In Bändermodellen des Flavivirins ist das Rückgrat von NS2B in Rosa und das Rückgrat von NS3 in Grau gezeigt. Die Sauerstoffatome von Wassermolekülen sind als rote Kugeln gezeigt. Sind spezifische NS2B- oder NS3-Reste oder deren Seitenketten gezeigt, so sind diese als Stäbchenmodell mit Stickstoffatomen in Blau, Sauerstoffatomen in Rot, Schwefelatomen in Gelb und Kohlenstoffatomen in Rosa (NS2B) bzw. Grau (NS3) dargestellt. Spezifische NS2B- und NS3-Reste sind nur dann als Stäbchenmodell gezeigt, wenn sie für das Verständnis an der jeweiligen Textstelle relevant sind. Dabei werden in der Regel nur das C_α und die Seitenkette gezeigt; die Rückgratatome außer dem C_α sind nur dann gezeigt, wenn deren Wechselwirkungen diskutiert werden. Polare Wechselwirkungen sind als schwarze gestrichelte Linien mit den zugehörigen Abständen in Å gezeigt. Ist die Längenangabe kursiv geschrieben, so beträgt die Länge dieser Wechselwirkung 3,6-3,7 Å. Van-der-Waals-, π - π - oder π - σ -Wechselwirkungen sind als orangefarbene gestrichelte Linien mit den zugehörigen Abständen in Å gezeigt; in diesem Falle ist die Länge in Klammern angegeben. Soll der Abstand zwischen zwei Atomen angegeben werden, ohne dass zwischen diesen beiden Atomen eine Wechselwirkung besteht, so wird dieser Abstand durch eine gelbe gestrichelte Linie mit kursiv geschriebenem Abstand in Å verdeutlicht. Nach Möglichkeit werden alle Protease-Inhibitor-Komplexe in der Standardorientierung und im gleichen Maßstab gezeigt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit variiert der Blickwinkel in der Regel dennoch von Abbildung zu Abbildung.

Abbildungen. Alle in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen wurden, wenn nicht anders angegeben, vom Verfasser erstellt. Zur Erstellung der Abbildungen wurden die Programme *PyMOL*,³ *Inkscape*⁴ und *ChemDraw*⁵ benutzt.

1 Einführung

1.1 Flaviviren

1.1.1 Allgemeines, Verbreitung, Übertragung, Krankheitsbild

Als Flaviviren werden die aktuell 53 Spezies der Gattung *Flavivirus* bezeichnet. Typspezies der Gattung und der übergeordneten Familie *Flaviviridae* ist das Gelbfiebervirus (von lat. *flavus* für „gelb“).⁶ Zahlreiche Flaviviren sind humanpathogen. Für die meisten Fälle menschlicher Infektionen waren im vergangenen Jahrzehnt das Gelbfieber-Virus (*Yellow fever virus*, YFV), das Dengue-Virus (DENV) mit vier bzw. fünf⁷⁻⁸ Serotypen, das Japanische-Enzephalitis-Virus (JEV), das West-Nil-Virus (WNV), das FSME-Virus (*Tick-borne encephalitis virus*, TBEV) mit drei Subtypen und das Zika-Virus (ZIKV) verantwortlich (Tab. 1.1).

Tabelle 1.1 Verbreitung und Übertragung einiger humanpathogener Flaviviren und deren Krankheitsbild im infizierten Menschen. *Ae.* = *Aedes*, *C.* = *Culex*, *I.* = *Ixodes*.

Spezies	Endemiegebiet	Krankheitsbild	Fallzahlen	Reservoir	Brückenvektor
DENV ⁹⁻¹⁰	Tropen, Subtropen	Fieber, Hämorrhagisches Fieber, Schock-Syndrom	> 100 Millionen	Primaten	<i>Ae. aegypti</i> <i>Ae. albopictus</i>
JEV ¹¹⁻¹²	Ost- und Südostasien, Australien	Fieber, Meningitis, Enzephalitis	35.000 – 70.000	Vögel, Schweine	<i>C. tritaeniorhynchus</i> <i>C. annulirostris</i>
TBEV ¹³⁻¹⁴	Europa, Nord- und Zentralasien	Fieber, Meningitis, Meningoenzephalitis	< 10.000	Nagetiere	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>
WNV ¹⁵⁻¹⁶	Weltweit	Fieber, Meningitis, Enzephalitis, schlafte Lähmung	< 10.000	Vögel	<i>C. pipiens</i> <i>C. tarsalis</i>
YFV ¹⁷⁻¹⁸	Afrika, Südamerika	Fieber, Hämorrhagisches Fieber, Leberversagen	> 100.000 schwere Verläufe in Afrika	Primaten	<i>Ae. spp.</i>
ZIKV ¹⁹⁻²¹	Amerika, Afrika, Asien	Fieber, Guillian-Barré-Syndrom, Fruchtschädigung	Tausende bis Millionen	Primaten	<i>Ae. aegypti</i> <i>Ae. furcifer</i>

Die meisten Flaviviren zirkulieren zwischen vertebratischen Reservoirwirten und arthropodischen Vektoren. Historisch trug die Gattung *Flavivirus* daher den Namen *Arbovirus*, Gruppe B.²² Das ehemalige Taxon *Arbovirus* ist ein Akronym für *arthropode-borne virus* („arthropodenübertragenes Virus“); heute wird der Begriff *Arbovirus* als nicht-taxonomischer Sammelbegriff für alle Virusspezies verwendet, die durch Arthropoden übertragen werden. Da für einige Flaviviren kein Vektor bekannt ist (von diesen sind vier humanpathogen), können Flaviviren nicht generell als Arboviren bezeichnet

werden.²³ Die natürliche Zirkulation vektorübertragener Flaviviren zwischen Reservoirwirten und Arthropoden wird als sylvatischer oder enzootischer Zyklus bezeichnet (Abb. 1.1).

Der Mensch ist für die meisten Flaviviren ein Fehlwirt. Das heißt, dass diese Flaviviren nicht von einem infizierten Menschen auf arthropodische Vektoren übertragen werden. Diejenigen Vektoren, die Flaviviren von einem Reservoirwirt auf den Menschen oder andere Fehlwirte übertragen, werden als Brückenvektoren bezeichnet (vgl. Tab. 1.1, S.1). Obwohl der Mensch für die meisten Flaviviren ein Fehlwirt ist, kann er dennoch als Folge einer Infektion Krankheitserscheinungen bis hin zum Tode entwickeln.

Das Dengue-, das Gelbfieber- und das Zika-Virus nehmen in der Gattung *Flavivirus* epidemiologische Sonderrollen ein: Diese drei Spezies können durch die Gelbfiebertmücke (*Aedes aegypti*) und die asiatische Tigermücke (*Aedes albopictus*) vektorieell von Mensch zu Mensch übertragen werden; der Mensch ist für diese drei Spezies folglich kein Fehlwirt. Die vektorielle Transmission von Mensch zu Mensch wird in Abgrenzung zum sylvatischen Zyklus als urbaner oder humaner Zyklus bezeichnet.²⁴⁻²⁷ Neben der horizontalen Transmission zwischen Arthropoden und Vertebraten spielt die transovariale Transmission (TOT), also die Übertragung von einer Arthropodengeneration auf die folgende, eine Rolle bei der Weiterverbreitung von Flaviviren.²⁸⁻²⁹ Für das Dengue- und das Zika-Virus ist des Weiteren die vertikale Übertragung von trächtigen Vertebraten auf den Fötus beschrieben,³⁰⁻³¹ für das Zika-Virus außerdem auch die sexuelle Transmission.³²

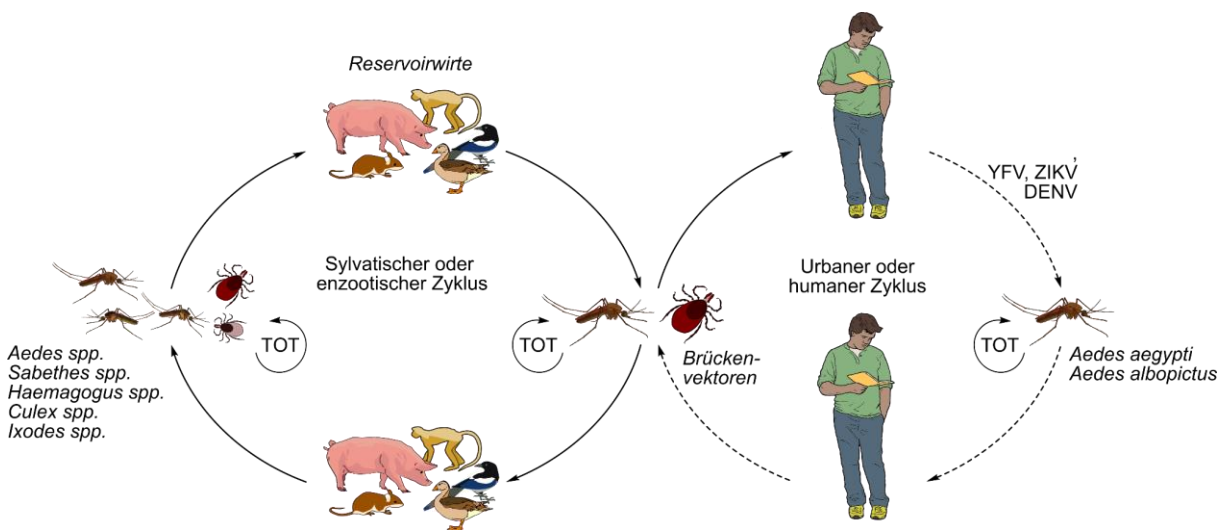


Abbildung 1.1 Übertragungszyklen von Flaviviren. Flaviviren zirkulieren im sylvatischen (enzootischen) Zyklus zwischen vertebratischen Reservoirwirten und arthropodischen Vektoren. Diejenigen Arthropoden, die Flaviviren von Reservoirwirten auf den Menschen übertragen, werden als Brückenvektoren bezeichnet. Für die Mehrzahl der Flaviviren ist der Mensch ein Fehlwirt. Das Dengue-, das Gelbfieber- und das Zika-Virus sind jedoch vektorieell durch *Ae. aegypti* oder *Ae. albopictus* von Mensch zu Mensch übertragbar. Diese Art der Übertragung wird als urbaner oder humaner Zyklus bezeichnet. Zur Flavivirus-Verbreitung trägt auch die transovariale Transmission (TOT), also die Übertragung von einer Arthropodengeneration auf die folgende, wesentlich bei. Teile der Abbildung entstammen der Open Clip Art Library und ChemDraw.

Die Mehrzahl der Flavivirusinfektionen verläuft beim Menschen mit milden Symptomen oder gänzlich symptomfrei. Die Zahl dieser milden Verläufe wird bei WNV-Infektionen³³ und ZIKV-Infektionen³⁴ auf je 80 %, bei DENV-Infektionen^{9,35} auf 30-80 % und bei YFV-Infektionen³⁶ auf 55 % geschätzt. Menschen mit TBEV-Infektion entwickeln in 20-30 % der Fälle ZNS-Symptome,³⁷ solche mit WNV-³⁸⁻³⁹ oder JEV-Infektion⁴⁰ in je 1 % der Fälle. Für das FSME-Virus werden die Sterberaten nach Entwicklung von ZNS-Symptomen wie folgt angegeben: 1 % für den europäischen, 2-3 % für den sibirischen und 20-40 % für den fernöstlichen Subtyp.⁴¹ Bildet sich nach einer JEV-⁴² oder WNV-Infektion³⁸ eine klinische Manifestation mit ZNS-Symptomen aus, so liegt die Sterblichkeit bei 20-30 % bzw. 5-10 %.

Schwere Verläufe einer DENV- oder YFV-Infektion manifestieren sich anders als ZIKV-, WNV-, JEV- und TBEV-Infektionen eher in vaskulären oder systemischen als in neurologischen Symptomen. Die Sterblichkeit nach schweren Dengue-Fieber- oder Gelbfieber-Verläufen liegt bei 4-20 %.^{18,43-45} Als Risikofaktor für einen schweren Dengue-Fieber-Verlauf gilt genau eine vorangegangene Infektion mit dem Dengue- oder mit dem Zika-Virus. Dieses Phänomen wird auf infektionsverstärkende kreuzreaktive Antikörper zurückgeführt (*antibody dependent enhancement*). Die Kreuzreaktivität ist besonders vor dem Hintergrund überlappender Endemiegebiete epidemiologisch relevant.⁴⁶

Schwere Verläufe oder Todesfälle treten als Folge einer ZIKV-Infektion verhältnismäßig selten auf.⁴⁷ Dass das Zika-Virus dennoch als Bedrohung für das öffentliche Gesundheitswesen angesehen wird, liegt vornehmlich an dessen Eigenschaft, transplazental von einer infizierten Schwangeren auf ihren Fötus übertragen zu werden.³⁰ Neben Fehl- und Frühgeburten, wie sie auch in Folge einer DENV-Infektion der Schwangeren auftreten, kann dies zu Fehlbildungen des Fötus, dem *Congenital Zika Syndrome* (CZS) führen. Das CZS schließt mit der Mikrozephalie eine schwere Fehlbildung des Gehirns ein.⁴⁸⁻⁴⁹

1.1.2 Der Aufbau flaviviraler Virionen

Flaviviren sind behüllte (+)-ss-RNA-Viren; ihr Erbgut liegt also auf einem RNA-Einzelstrang positiver Leserichtung vor. Das flavivirale Genom codiert einen einzelnen, offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF), der von untranslatierten Regionen (UTR) flankiert wird. Flaviviren besitzen, wie auch die übrigen Spezies der *Flaviviridae*, keinen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende ihres Genoms. Typisch für die Gattung *Flavivirus* ist die Cap-Struktur vom Typ I (m⁷GpppAmp) am 5'-Ende; diese Typ-I-Cap-Struktur ist das Kriterium zur taxonomischen Abgrenzung von anderen Gattungen der *Flaviviridae*.^{22,50-51}

Die Viruspartikel sind von sphärischer Gestalt mit einem Durchmesser von ca. 50 nm und enthalten die genomische RNA, die in einem Nucleocapsid verpackt ist. Das Nucleocapsid ist aus Capsidproteinen („C“) aufgebaut und in die Virushülle eingebettet (Abb. 1.2A, S.4). Die C-Proteine besitzen eine hydrophobe Domäne zur Verankerung in der viralen Lipidhülle und eine zweite, an basischen Aminosäureresten reiche Domäne, die an die virale RNA bindet.⁵²⁻⁵³ Die Virushülle besteht aus einer

Lipidmembran, die sich von Membranen der Wirtszelle ableitet, und den darin verankerten Membran- bzw. prä-Membran- („M“/„prM“), Hüll- („E“ für *envelope*) und C-Proteinen. Ein Teil der Lipide und Proteine der Virushülle liegt glykosyliert vor, wobei das Glykosylierungsmuster von der Art der Wirtszelle abhängt. Die Anordnung der M/prM- und E-Proteine reifer Virionen unterscheidet sich von der unreifer, nicht-infektiöser Viruspartikel. Auf der Oberfläche unreifer Virionen liegen 60 ikosaedrisch angeordnete (prM-E)-Trimere vor, die mit prM als exponierter Spitze ausgerichtet sind. Im Zuge der Virusreifung wird die pr-Domäne von prM proteolytisch abgespalten, sodass im reifen Virion nach einer Reorganisation der Oberfläche 90 (M-E)-Dimere in sphärischer Anordnung vorliegen.⁵⁴⁻⁵⁹ Das glykosylierte E-Protein („E-Glykoprotein“) ist ein virales Klasse-II-Fusionsprotein und im Rahmen des viralen Zelleintritts maßgeblich an der Anlagerung an die Wirtszelle und der Fusion mit der Wirtsmembran beteiligt (Abb. 1.2B).⁶⁰⁻⁶¹

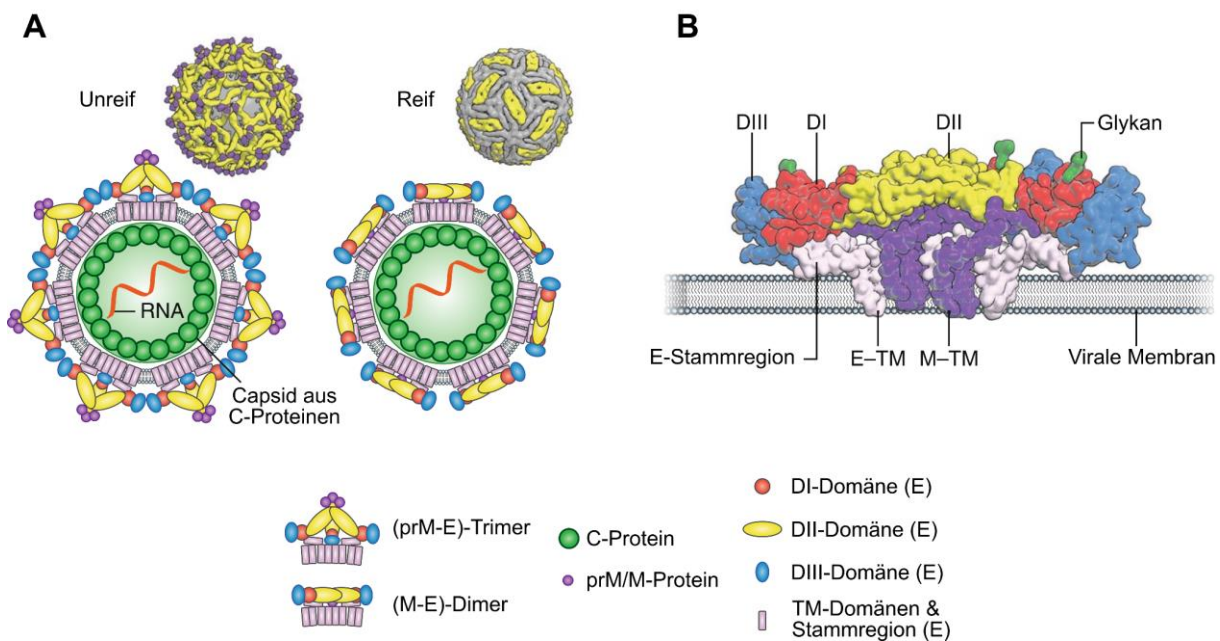


Abbildung 1.2 Aufbau flaviviraler Virionen (**A**) und des flaviviralen (M-E)-Dimers (**B**). C: Capsidprotein; DI: Domäne I / Zentrale Domäne; DII: Domäne II / Dimerisierungsdomäne; DIII: Domäne III / Immunglobulinartige Domäne; E: Hüllprotein (envelope); M: Membranprotein; prM: Prämembranprotein; TM: Transmembrandomäne. *Adaptiert und übersetzt mit Genehmigung durch Springer Nature Customer Service Centre GmbH / Adapted and translated by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Nature, Nature Microbiology: The continued threat of emerging flaviviruses, T. C. Pierson, M.S. Diamond, Copyright © 2020, Springer Nature Limited.*⁶² Lizenznummer / License Number: 5297260990754.

1.1.3 Der flavivirale Replikationszyklus

Die flavivirale Replikation (Abb. 1.3) beginnt mit der Anlagerung an eine Wirtszelle.⁶³ Als Anlagerungsfaktoren sind Glykosaminoglykane (GAG) wie Heparansulfat,⁶⁴ calciumabhängige Lektine (DC-SIGN⁶⁵, Mannose-Rezeptor⁶⁶), Phosphatidylserinrezeptoren (TIM- und TAM-Rezeptoren⁶⁷), der EGF-Rezeptor⁶⁸ und weitere membrangebundene Wirtspoteine identifiziert.^{63,69-70} Die Anlagerungsfaktoren binden entweder an das virale E-Glykoprotein oder an die virale Lipidhülle. Die wirtseigenen Oberflächenproteine und -proteoglykane sind teilweise spezifisch für die Oberfläche bestimmter

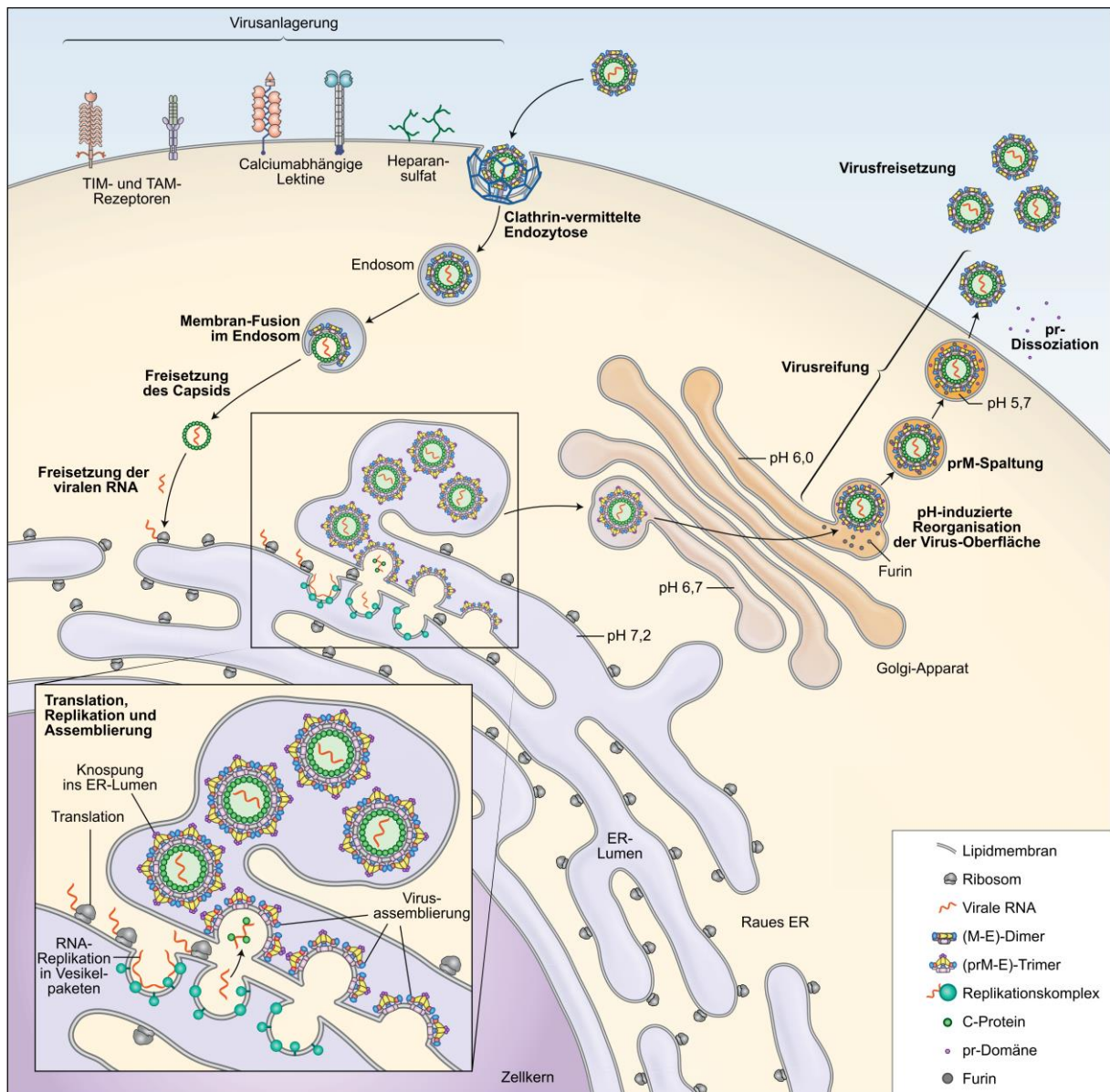


Abbildung 1.3 Flaviviraler Replikationszyklus. *Adaptiert und übersetzt mit Genehmigung durch Springer Nature Customer Service Centre GmbH / Adapted and translated by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Nature, Nature Microbiology: The continued threat of emerging flaviviruses, T. C. Pierson, M.S. Diamond, Copyright © 2020, Springer Nature Limited.*⁶² Lizenznummer / License Number: 5297260990754.

Zelltypen. Die große Bandbreite möglicher Anlagerungs- bzw. Eintrittsfaktoren führt zu einer entsprechend großen Zahl von Zelltypen, die von Flaviviren befallen werden können. Bisher sind der genaue Mechanismus des Viruseintritts und die genaue Rolle der Anlagerungsfaktoren nicht gänzlich verstanden. Bekannt ist, dass Flaviviren mittels Clathrin-vermittelter Endozytose in die Zelle gelangen.⁷¹⁻⁷² Die Absenkung des pH-Werts in den Endosomen durch vakuoläre ATPasen induziert eine Reihe von Konformationsänderung des E-Proteins, die in einer Fusion der viralen mit der endosomalen Membran resultieren.⁷³⁻⁷⁴ Infolgedessen wird das freigesetzte Nukleocapsid ubiquitinyliert, woran anschließend die virale RNA ins Cytoplasma entlassen wird (*uncoating*).⁷⁵⁻⁷⁶ Diese nimmt zunächst die Rolle einer mRNA ein und wird am rauen ER in ein Polyprotein translatiert, das alle strukturellen und nicht-strukturellen Proteine enthält (Abb. 1.4) Die Prozessierung des Polyproteins durch Signalpeptidasen im ER-Lumen und durch Flavivirin im Cytosol führt zur Freisetzung der drei strukturellen Proteine (C, E und prM) und der sieben nicht-strukturellen Proteine (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5).⁷⁷ Die virale Protease ist auf dem N-terminalen Drittel von NS3 lokalisiert und benötigt NS2B als Cofaktor. Der proteolytisch aktive Komplex aus NS2B und NS3 wird als Flavivirin bezeichnet.⁷⁸

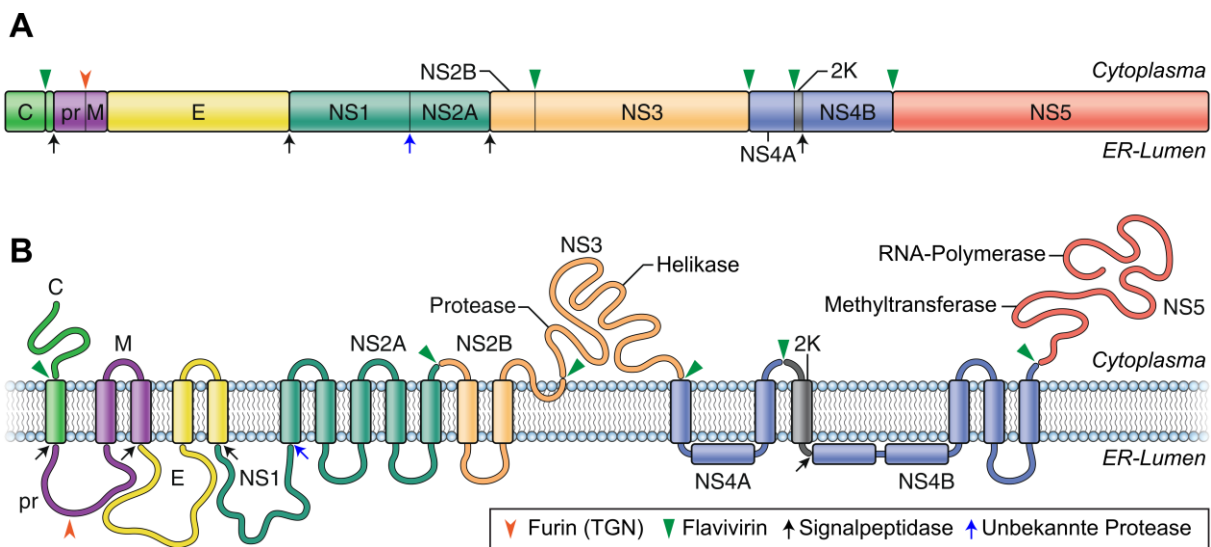


Abbildung 1.4 Das flavivirale Polyprotein. **(A)** Übersicht mit Protease-Schnittstellen. **(B)** Detaillierte Ansicht mit Transmembrandomänen und funktionellen Domänen mit Protease-Schnittstellen. Die Abspaltung der pr- von der M-Domäne durch Furin erfolgt im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN). *Adaptiert und übersetzt mit Genehmigung durch Springer Nature Customer Service Centre GmbH / Adapted and translated by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Nature, Nature Microbiology: The continued threat of emerging flaviviruses, T. C. Pierson, M.S. Diamond, Copyright © 2020, Springer Nature Limited.*⁶² Lizenznummer / License Number: 5297260990754.

Durch die Wechselwirkung zwischen den prozessierten viralen Proteinen und der viralen RNA kommt es zur Ausbildung der Vesikelpakete (VP, „vesicle packets“), in denen die Replikation der viralen RNA an sogenannten Replikationskomplexen stattfindet.⁷⁹⁻⁸² Die Vesikelpakete sind organellähnliche Membrankompartimente, die einerseits die RNA-Replikation von wirtseigenen Ribonukleasen und

Immunsensoren abschirmen und andererseits die zur Replikation nötigen Metaboliten konzentrieren. Die Vesikelpakete sind über eine tunnelartige Pore mit einem Durchmesser von etwa 10 nm mit dem Cytoplasma verbunden.⁸³⁻⁸⁴ Durch die Pore bleibt die Bewegung replizierter RNA zu den Ribosomen des rauen ER, und damit die Synthese weiterer viraler Proteine, möglich. Des Weiteren gelangen durch die Pore die Metaboliten, u.a. Nukleotide, vom Cytosol zum Replikationskomplex. Der Replikationskomplex selbst besteht aus allen nicht-strukturellen viralen Proteinen und der viralen RNA. Während NS1 und die Transmembranproteine NS2A, NS2B, NS4A und NS4B strukturelle Aufgaben übernehmen und den Komplex in der Membran des Vesikelpakets verankern, werden die funktionellen Aufgaben von der auf NS3 lokalisierten Helikasedomäne sowie der RNA-Methyltransferase und der RNA-abhängigen RNA-Polymerase, die am *N*- bzw. *C*-Terminus von NS5 lokalisiert sind, übernommen.⁸⁵⁻⁸⁷ Der anfänglich vorhandene (+)-RNA-Einzelstrang wird von der Polymerase zu einem RNA-Doppelstrang vervollständigt, der anschließend von der Helikase entwunden wird. Die NS5-Methyltransferase ist am Aufbau der typischen 5'-Cap-Struktur beteiligt. Der neu synthetisierte (-)-RNA-Einzelstrang dient als Vorlage für die weitere Transkription. Der (+)-Strang wird entweder an den Ribosomen in neue virale Proteine translatiert oder gemeinsam mit den strukturellen Proteinen C, E und prM zu unreifen Virionen assembliert.⁸⁸ Zur Bildung der Vesikelpakete ist eine Modifizierung des Wirtsmetabolismus nötig: Insbesondere werden in Folge einer Flavivirusinfektion die Änderung des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels und des Lipidstoffwechsels beobachtet.⁸⁹⁻⁹⁰ Mehr zur Rolle wirtseigener Maschinerien in der Virusreplikation ist in entsprechender Literatur zu finden.^{70,91} Die viralen Assemblierungsbereiche befinden sich nahe den Vesikelpaketen im ER. Die Knospung (*budding*) erfolgt nach der Assemblierung ins ER-Lumen hinein, von wo aus die unreifen Virionen auf dem sekretorischen Weg durch den Golgi-Apparat ins Trans-Golgi-Netzwerk transportiert werden. Die dortige saure Umgebung (pH 6,0) bewirkt eine Konformationsänderung der Proteine an der Virionenoberfläche, wodurch die prM-Spaltstelle für die Proproteinkonvertase Furin zugänglich wird. Die Abspaltung der pr-Domäne von der M-Domäne durch Furin induziert eine Reorganisation der Virionenoberfläche im Zuge derer sich die (prM-E)-Trimere zu (M-E)-Dimeren umlagern. Die abgespaltenen pr-Domänen verbleiben in der sauren Umgebung des sekretorischen Weges bis zur viralen Exozytose mit dem Virion assoziiert und dissoziieren erst bei höheren pH-Werten im extrazellulären Milieu.^{55-57,92} Die Kaskade aus pH-induzierter Konformationsänderung, prM-Spaltung und der pr-Dissoziation wird als Virusreifung bezeichnet. Nur reife Virionen können über ihr E-Glykoprotein an Oberflächenstrukturen von Wirtsmembranen binden. Das E-Glykoprotein unreifer Virionen ist durch das exponierte prM-Protein abgeschirmt. Dadurch werden unproduktive Interaktionen mit Membranen während des Transports vom ER ins Trans-Golgi-Netzwerk verhindert.

1.1.4 Prävention und Therapie

Gegen das Japanische-Enzephalitis-, das FSME- und das Gelbfieber-Virus existieren verträgliche, effektive Impfstoffe, die für die Anwendung am Menschen zugelassen sind.⁹³⁻⁹⁴ Zur Immunisierung gegen das West-Nil-Virus sind Impfstoffe bisher nur für anfällige Tierarten zugelassen.⁹⁵ Inzwischen existiert auch ein DENV-Impfstoff, allerdings nur zur eingeschränkten Nutzung: Werden mit diesem DENV-naive Menschen geimpft, erhöht sich für diese das Risiko, durch eine folgende DENV-Infektion schwer zu erkranken. Dabei tritt eine vergleichbare antikörperabhängige Infektionsverstärkung wie nach einer einmaligen DENV- oder ZIKV-Infektion auf. Daher werden mit dem DENV-Vakzin nur Individuen immunisiert, die nachweislich mindestens eine DENV-Infektion durchgemacht haben.⁹⁶ Zur Immunisierung gegen das Zika-Virus ist noch kein Impfstoff zugelassen, einige Kandidaten befinden sich allerdings in klinischen Studien, einer davon in Phase II (2020).⁹⁷

Zur spezifischen antinflaviviralen Therapie existieren keine zugelassenen Wirkstoffe. Patienten werden entsprechend ausschließlich symptombezogen behandelt. Die Gefährlichkeit einer Infektion ungeimpfter Individuen mit dem Dengue-, Japanische-Enzephalitis-, FSME- oder Gelbfieber-Virus, die begrenzte Einsatzmöglichkeit des DENV-Impfstoffs und das Fehlen zugelassener WNV- und ZIKV-Vakzine sind Gründe, die Entwicklung antinflaviviraler Wirkstoffe voranzutreiben. Dies gilt besonders vor dem Hintergrund wachsender Habitate der Vektoren *Ae. aegypti* und *Ae. albopictus* und einer wachsenden Bevölkerung in endemischen Gebieten.⁹⁸ Targets zur Entwicklung von Virostatika sind neben den viralen Proteinen und auch wirtseigene Proteine, die an der viralen Replikation und Pathogenese beteiligt sind.⁷⁰ Unter den viralen Proteinen gelten Flavivirin und die NS5-Polymerase als mögliche Zielstrukturen.⁹⁹⁻¹⁰¹ Dies liegt zum einen an der Verfügbarkeit struktureller Daten aus Cryo-EM- und Röntgen-Kristallstrukturen, zum anderen daran, dass zur Hemmung verwandter Proteine anderer RNA-Viren zugelassene Wirkstoffe existieren: Inhibitoren der Protease des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) werden in der antiretroviralen Kombinationstherapie eingesetzt. Die HIV-Protease übernimmt im viralen Replikationszyklus eine ähnliche Funktion wie Flavivirin, bedient sich aber als Aspartylprotease eines anderen Katalysemechanismus.¹⁰² Therapiert werden kann auch die durch das Hepatitis-C-Virus (HCV) ausgelöste Hepatitis-C-Erkrankung. Das Hepatitis-C-Virus ist eine Spezies der Gattung *Hepacivirus*, die wie die Gattung *Flavivirus* zur Familie der *Flaviviridae* zählt. Zwei Targets, die in der HCV-Kombinationstherapie adressiert werden, sind die NS3-NS4A-Protease und die NS5B-Polymerase, die in Struktur und Funktion ihren flaviviralen Analoga (Flavivirin, NS5-Polymerase) entsprechen.¹⁰³ Kürzlich wurde das flavivirale NS4B als Target identifiziert: Durch die Bindung niedermolekularer Verbindungen an NS4B wird die korrekte Anlagerung an NS3 unterbunden. Dadurch wird die NS3-Helikase-Aktivität verringert, was *in cellulo* und *in vivo* zu einer drastischen Hemmung der Virusvermehrung führt.¹⁰⁴ Wegen der großen Zahl an Wirtsfaktoren, die für die Flavivirusvermehrung essentiell sind, ist die Zahl potentieller wirtseigener Targets entsprechend groß; Beispiele für solche Targets sind Furin und die Enzyme des Lipidmetabolismus.^{70,90,105-108}

1.2 Die flavivirale Protease (Flavivirin)

1.2.1 Die Struktur des Flavivirins

Die flavivirale Protease (Flavivirin) ist auf dem N-terminalen Drittel des nicht-strukturellen Proteins 3 (NS3) lokalisiert. Zur Ausbildung ihrer katalytischen Aktivität ist eine hydrophile Domäne des nicht-strukturellen Proteins 2B (NS2B) als Cofaktor notwendig. Daher wird Flavivirin häufig als NS2B-NS3-Protease bezeichnet. Flavivirin ist eine Serinprotease mit einer konservierten katalytischen Triade aus den NS3-Resten S135, H51 und D75 (bzw. S138, H53 und D77 bei der YFV-Protease¹⁰⁹) und schneidet bevorzugt hinter di- oder tribasischen Aminosäuresequenzen; eine Übersicht über die Konservierung der Primärstruktur des Flavivirins gibt Abbildung 1.5.¹¹⁰

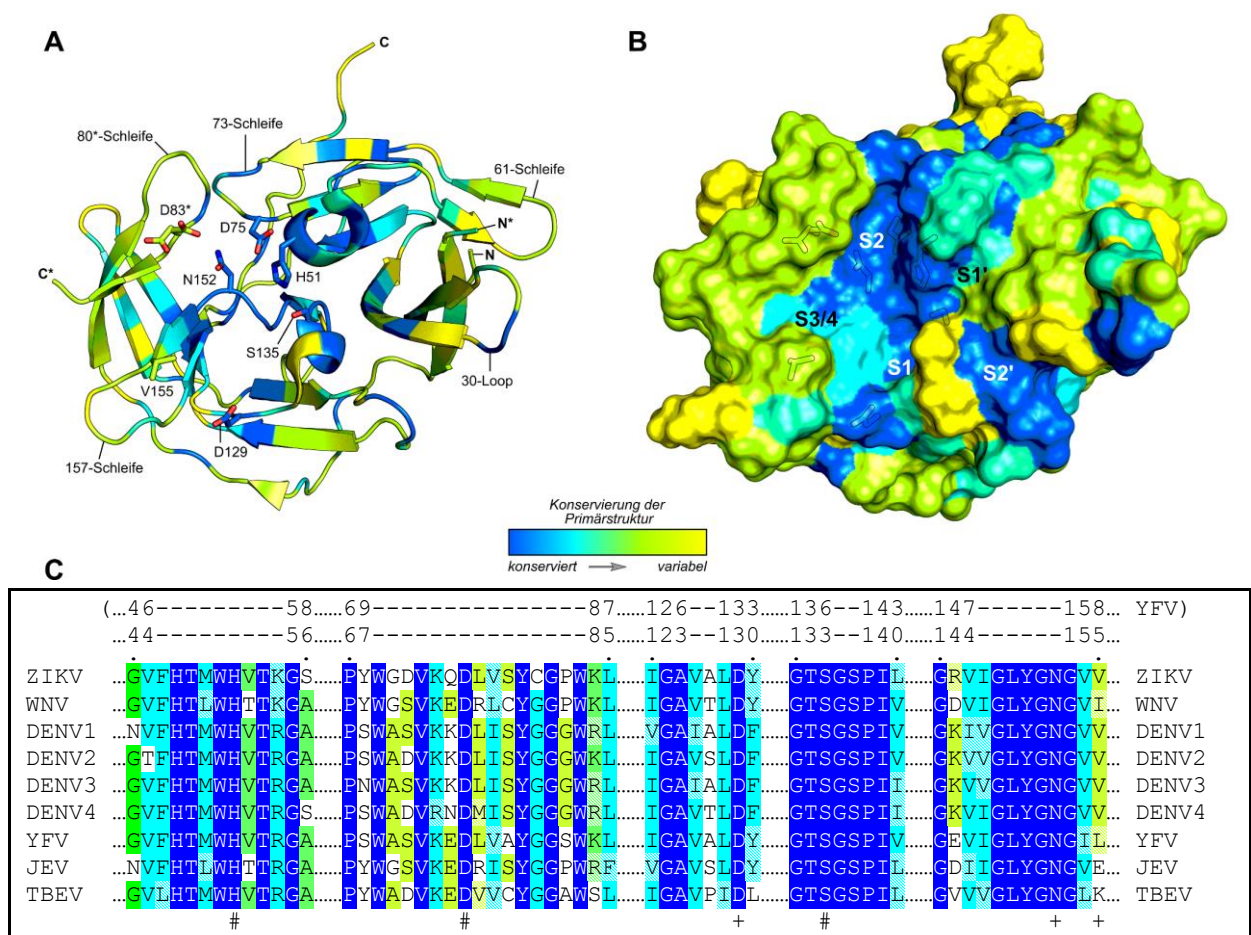


Abbildung 1.5 Konservierung der Primärstruktur des Flavivirins. **(A)** Bändermodell der ZIKV-Protease in der geschlossenen Konformation. Die Seitenketten der Reste der katalytischen Triade (S135, H51, D75; YFV: S138, H53, D77) und weiterer Reste sind als Stäbchenmodell mit Kohlenstoff je nach Konservierungsgrad, Stickstoff in Blau und Sauerstoff in Rot dargestellt. Zusätzlich sind einige im Text diskutierte Sekundärstrukturelemente gekennzeichnet. C: C-Terminus der NS3-Kette; C*: C-Terminus der NS2B-Kette; N: N-Terminus der NS3-Kette; N*: N-Terminus der NS2B-Kette. PDB: 6Y3B. **(B)** Die ZIKV-Protease in der geschlossenen Konformation, dargestellt als Conolly-Oberfläche; die Oberfläche ist nach Konservierungsgrad der unterliegenden Aminosäurereste eingefärbt. PDB: 6Y3B. **(C)** Aminosäuresequenz-Alignment konservierter Bereiche der NS3-Protease. Konservierte Reste auf einer entsprechenden Position sind farbig unterlegt; abweichende Aminosäuren mit einer *Grantham Difference*¹¹¹ < 30 sind schraffiert unterlegt. Die Reste der katalytischen Triade sind mit #, die Reste D129, N152 und V155 (YFV-Protease: D132, N155, L158) mit + markiert.

Die Substratspezifität wird durch eine Vielzahl von Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren, unter welchen sich mehrere bei physiologischem pH negativ geladene Gruppen befinden, festgelegt. Abbildung 1.6 gibt am Beispiel der ZIKV-Protease im Komplex mit dem substratanalogen Liganden **1** eine Übersicht über elektrostatisches Potential und Wechselwirkungen im aktiven Zentrum.¹¹²

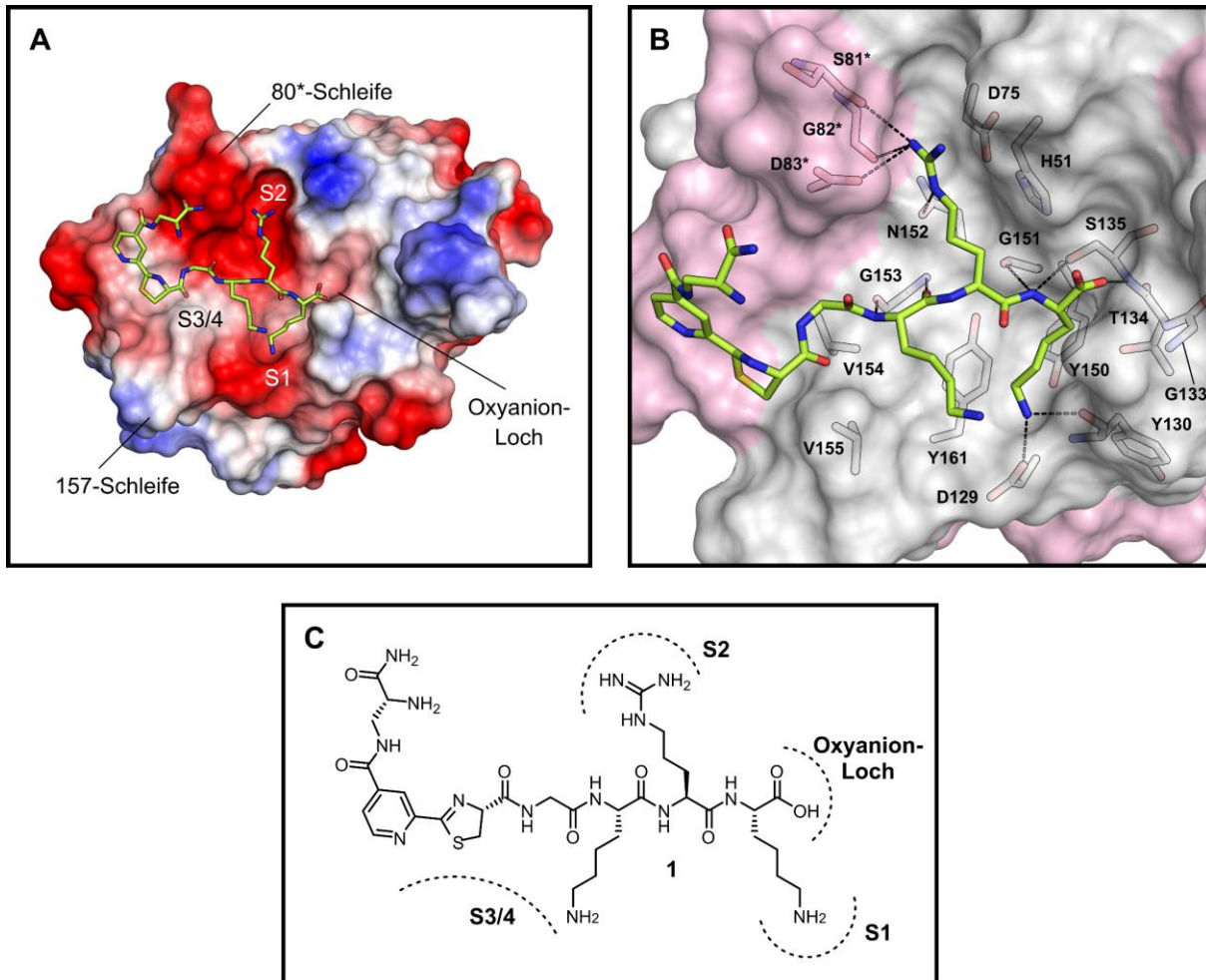


Abbildung 1.6 Struktur der ZIKV-Protease im Komplex mit dem Liganden **1**. (A) ZIKV-Protease eingefärbt nach elektrostatischem Potential (negativ in Rot, positiv in Blau). PDB: 7DOC. (B) Interaktionen des Liganden **1** im aktiven Zentrum der ZIKV-Protease. NS2B und NS3 sind in Rosa bzw. Grau dargestellt. Die interagierenden Reste sowie einige weitere, das aktive Zentrum definierende Reste der Protease sind als konturierte Stäbchenmodelle gezeigt. PDB: 7DOC. (C) Struktur des Liganden **1** mit schematischer Positionierung der Reste in den Bindetaschen der ZIKV-Protease.

Die folgenden Erläuterungen beziehen sich vielfach auf Inhalte der Abbildungen 1.5 (S.9) und 1.6, ohne dass explizit darauf hingewiesen wird. Es sei außerdem angemerkt, dass die Nummerierung der NS3-Reste der YFV-Protease von der der übrigen Proteasen abweicht (Abb. 1.5C). Bezüglich der Tertiärstruktur des Flavivirins sei an dieser Stelle schon auf Abbildung 1.7 (S.12-13) verwiesen.

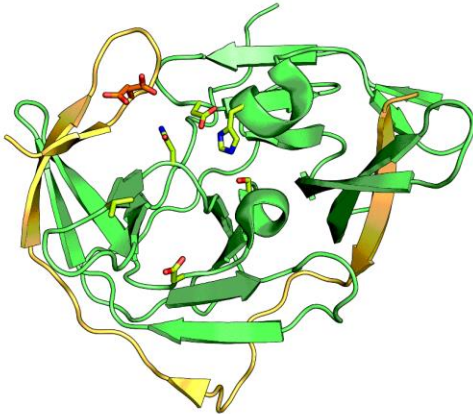
Die Primärstruktur des Flavivirins ist im Bereich des aktiven Zentrums hochkonserviert und steigt mit der Nähe zur katalytischen Triade. Besonders hervorzuheben unter den konservierten Resten ist außer

der katalytischen Triade G133, das mit S135 das Oxyanionloch bildet. Zu 100 % konserviert sind außerdem D129 am Boden der S1- und N152 in der S2-Bindetasche, sowie die GLYGNG-Sequenz am Boden des aktiven Zentrums (NS3-Reste 148-153). Diese Reste sind maßgeblich an der Substraterkennung und -bindung beteiligt. Das Rückgrat der GLYGNG-Sequenz bindet dabei über eine Struktur, die einem antiparallelen β -Faltblatt gleicht, an das Rückgrat eines Substratmoleküls. Die Seitenkette des D129 am Boden der S1-Bindetasche sorgt für die Präferenz des Flavivirins für Arginin oder Lysin als P1-Rest. Des Weiteren sind in der S1-Tasche polare Wechselwirkungen zwischen Substrat und dem Rückgrat der nicht-konservierten Reste 130 und 131 möglich. Begrenzt wird die S1-Tasche durch die Seitenketten des konservierten Y150 aus der GLYGNG-Sequenz und des Y161 (YFV-Protease: F164). Wegen der hydrophoben Begrenzung der S1-Tasche zeigt Flavivirin auch eine Affinität zu peptidischen Inhibitoren mit hydrophober bzw. aromatischer P1-Seitenkette.

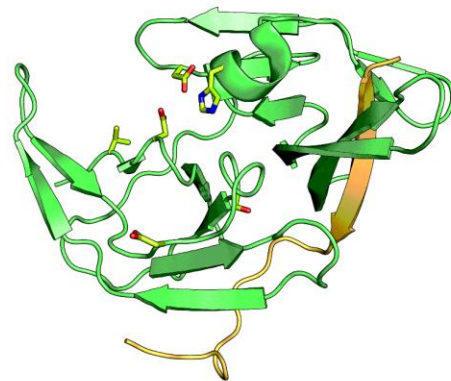
Die S2-Bindetasche ist im Vergleich zur S1-Tasche deutlich enger und wird im Wesentlichen durch Wasserstoffbrückenakzeptoren und -donoren definiert (NS2B-Reste 83*-85*, H51 und D75 aus der katalytischen Triade und N152 aus der GLYGNG-Sequenz). Bedingt durch diese Charakteristika besitzt die S2-Tasche eine hohe Affinität zu Lysin- und Arginin-Seitenketten. Die S3- und die S4-Tasche sind weder strukturell noch bezüglich ihrer Spezifität klar definiert, sodass vom S3/4-Bereich gesprochen werden sollte. Bei kanonischem Bindungsmodus, das heißt mit alternierend ausgerichteten Seitenketten des Liganden (wie bei Verbindung 1), ragt die Seitenkette des P3-Rests oberhalb der S1-Tasche und der 157-Schleife ins Lösungsmittel. Wegen dieser wenig ausgeprägten S3-Bindetasche ist Flavivirin P3-Resten gegenüber undiskriminierend; dennoch existiert eine Präferenz für basische Reste, die jedoch weniger ausgeprägt ist als in der P2- und der P1-Position. Der P4-Rest ist in der Regel im Bereich der 157-Schleife in der Nähe der hydrophoben Reste 154 und 155 (i.d.R. V, I oder L) positioniert. Daher gibt es hier eine Präferenz für hydrophobe Aminosäuren, allerdings werden auch andere Reste, darunter solche mit sauren und basischen Seitenketten, toleriert.¹¹³⁻¹¹⁴

Anders als die Primärstruktur der NS3-Kette ist die Primärstruktur der NS2B-Kette nur wenig konserviert. Bemerkenswert ist die Position 83* (entspricht 84* bei der WNV-Protease¹¹⁵): Im Falle der vier DENV-Serotypen befindet sich hier entweder ein Serin oder Threonin, bei der YFV-Protease ein Glutamin, bei der WNV- und der TBEV-Protease ein Asparagin und bei der JEV- und der ZIKV-Protease ein Aspartat. Obwohl all diese Reste prinzipiell über eine polare Interaktion an die P2-Seitenkette des Substrats binden können, handelt es sich bei einer solchen Interaktion nur bei der JEV- und der ZIKV-Protease um eine Salzbrücke. Die Salzbrücke in der S2-Tasche führt zur vergleichsweise hohen Aktivität der ZIKV-Protease („Hyperaktivität“).¹¹⁶

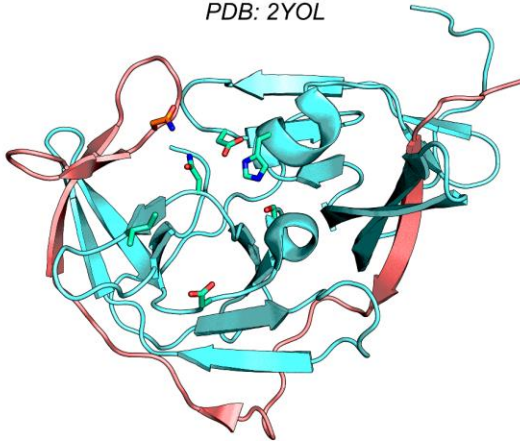
A ZIKV-Protease
geschlossene Konformation
PDB: 6Y3B



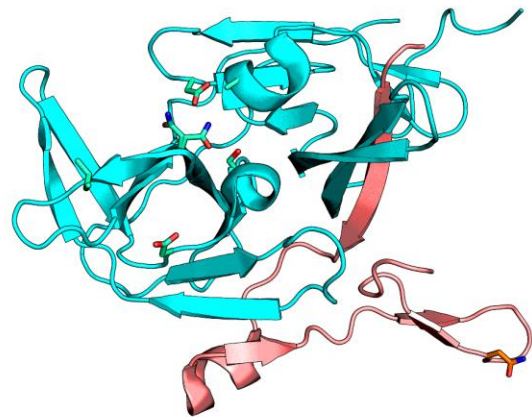
B ZIKV-Protease
offene Konformation
PDB: 5GXJ



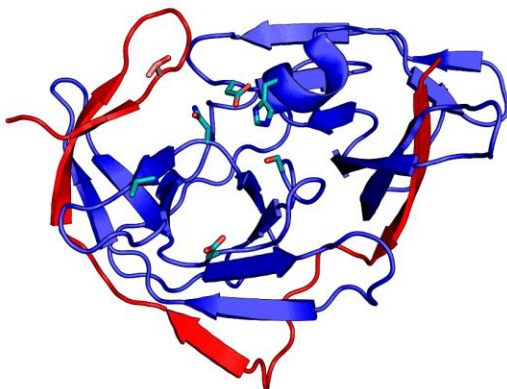
C WNV-Protease
geschlossene Konformation
PDB: 2YOL



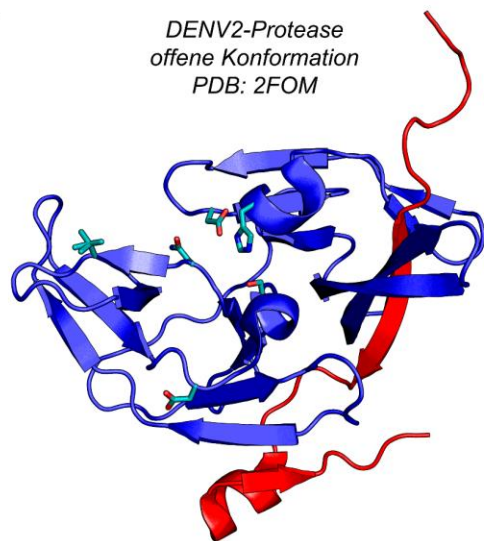
D WNV-Protease (H51A-Mutante)
offene Konformation
PDB: 2GGV



E DENV3-Protease
geschlossene Konformation
PDB: 3U11



F DENV2-Protease
offene Konformation
PDB: 2FOM



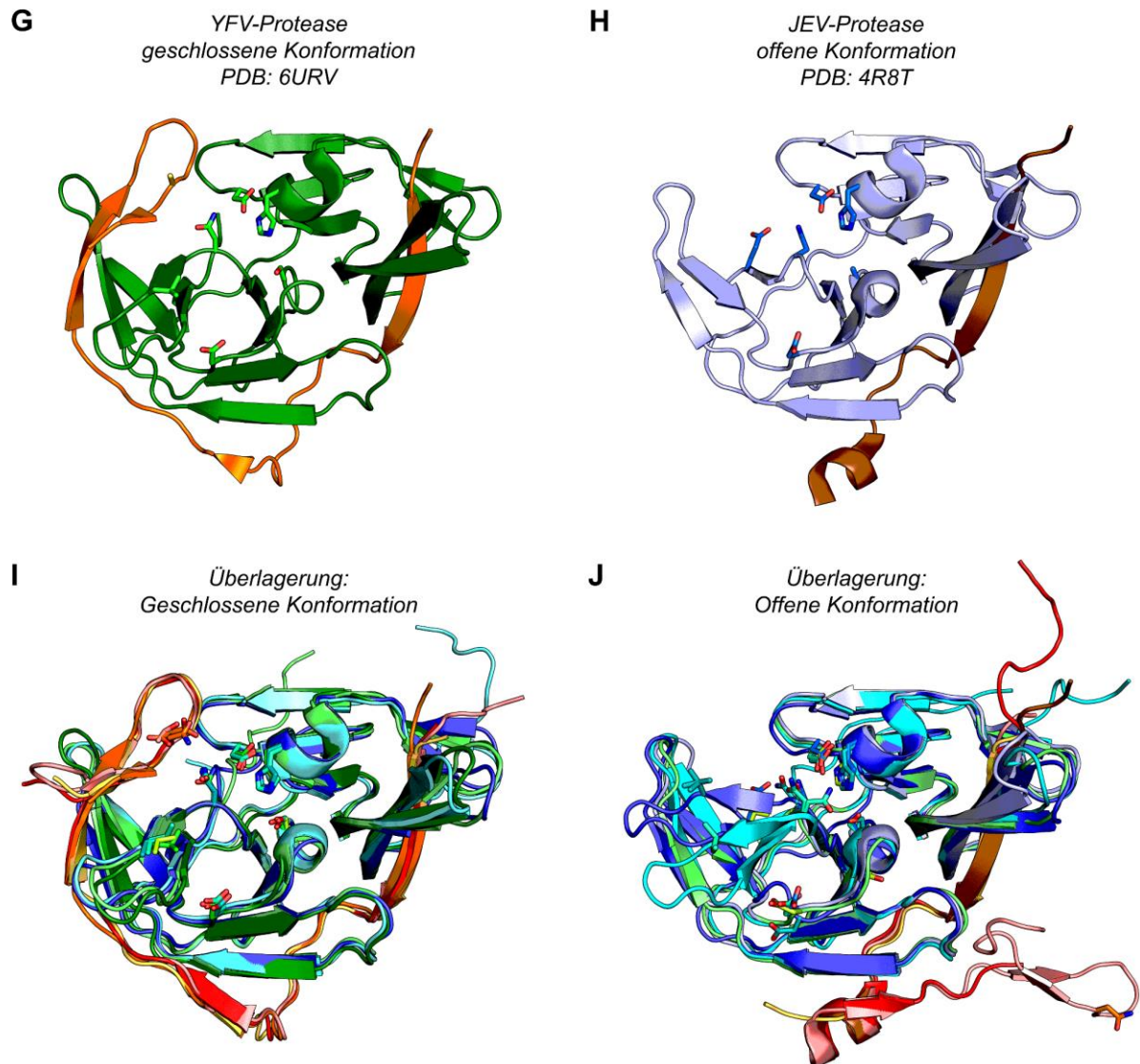


Abbildung 1.7 Tertiärstruktur des Flavivirins. Bei den geschlossenen Konformationen sind vorhandene Liganden nicht gezeigt. Die NS3-Kette und die NS2B-Kette sind jeweils als Bändermodell dargestellt; die Reste der katalytischen Triade S135 (Tafel D: A135), H51 und D75, die NS3-Reste D129, N152 und 155 (Tafel G: S138, H53, D77; NS3-Reste D132, N155, L158) sowie der NS2B-Rest 83* (Tafeln C, D: 84*) sind als konturierte Stäbchenmodelle gezeigt. Farben der NS3- bzw. NS2B-Kette: (A) und (B): NS3 in Hellgrün, NS2B in Gelb; (C) und (D): NS3 in Cyan, NS2B in Rosa; (E) und (F): NS3 in Dunkelblau, NS2B in Rot; (G): NS3 in Dunkelgrün, NS2B in Orange; (H): NS3 in Hellviolettblau, NS2B in Braun; (I) und (J): Je nach Protease in den unter (A) bis (H) angegebenen Farben.

Da bereits der Komplex aus der NS3-Proteasedomäne und der hydrophilen NS2B-Domäne proteolytisch aktiv ist, werden zur biochemischen Forschung in der Regel verkürzte Flavivirinkonstrukte ohne die hydrophoben NS2B-Transmembrandomänen und die NS3-Helikasedomäne verwendet. Die exakten Längen der NS3- und NS2B-Domänen variieren von Konstrukt zu Konstrukt und liegen entweder nicht-kovalent assoziiert oder über eine G_4SG_4 -Linkersequenz (G_4SG_4 -linked) kovalent verknüpft vor.^{109,116-119} Bei den nicht-kovalent assoziierten Konstrukten wird nach der Art der rekombinanten Herstellung zwischen zwei Varianten unterschieden: Bei den binären Konstrukten (*binary*) werden die NS2B- und

die NS3-Kette durch Koexpression entsprechender Gene als getrennte Ketten hergestellt.¹²⁰⁻¹²² Bei den autokatalytisch gespaltenen Konstrukten (*auto-cleaved* oder *enzyme-cleaved*) wird ein Gen exprimiert, das für ein Proprotein codiert, in dem die gekürzten NS2B- und NS3-Ketten über eine NS3-Spaltstelle miteinander verknüpft sind. Während der rekombinanten Proteinherstellung oder der anschließenden Reinigung kommt es an dieser Spaltstelle zur Autoaktivierung.¹²³⁻¹²⁴ Die folgenden Erläuterungen zur Tertiärstruktur der Flavivirins beziehen sich auf rekombinant hergestellte, verkürzte Konstrukte. Da sich die Konformation dieser gekürzten Komplexe nicht wesentlich von der des Volllängen-Flavivirins unterscheidet, gelten diese Erläuterungen auch für das Wildtyp-Flavivirin.^{77,125-126}

Es sind zwei unterschiedliche Konformationen des Flavivirins bekannt: Erstens die katalytisch aktive, „geschlossene“ Form und zweitens die inaktive bzw. wenig aktive, „offene“ Form (Abb. 1.7, S.12-13).¹²⁷ In beiden Formen ist die katalytische Triade zwischen zwei β -Fässern, die jeweils aus sechs β -Strängen bestehen, lokalisiert. In der geschlossenen Konformation liegt östlich der katalytischen Triade der *N*-Terminus der NS2B-Kette mit der *N*-terminalen 30-Schleife der NS3-Kette als antiparalleles β -Faltblatt verknüpft vor. Die übrige NS2B-Kette umschmiegt NS3 im Süden und Westen bevor sich ihre *C*-terminale 80*-Schleife von Nordwesten her auf das aktive Zentrum legt und dieses aus dieser Richtung „schließt“. Die Tertiärstruktur der geschlossenen Konformation ist hochkonserviert. Dies gilt insbesondere für die katalytische Triade, die GLYGNG-Sequenz (NS3-Reste 148-153) mit N152 und für die β -Stränge bzw. β -Fässer, die das aktive Zentrum einrahmen. Konserviert ist auch die Konformation der 157-Schleife, der 80*-Schleife und die Position des D129 am Boden der S1-Tasche. Die Ausrichtung der GLYGNG-Sequenz und der 157-Schleife ist für die proteolytische Aktivität essentiell.¹²⁸

Die offene Konformation unterscheidet sich von der geschlossenen vor allem durch die Positionierung der NS2B-Kette. Zwar liegt im Osten die β -Faltblattstruktur zwischen den *N*-Termini von NS2B und NS3 auch hier vor, es fehlt jedoch die westliche Umschmiegung inklusive der nordwestlichen, schließenden 80*-Schleife. Im Süden bildet NS2B eine anderthalb Windungen lange, in der geschlossenen Konformation nicht vorhandene α -Helix. Der *C*-Terminus der NS2B-Kette bildet auch in der offenen Konformation der WNV-Protease die 80*-Schleife (Abb. 1.7D); in den Kristallstrukturen der übrigen Proteasen sind die entsprechenden Reste nicht aufgelöst, sodass über die exakte Lage des *C*-terminalen NS2B-Segments keine Aussage getroffen werden kann (Abb. 1.7B, F und H). Der Substraterkennungsbereich der NS3-Kette ist in der offenen Konformation anders positioniert als in der geschlossenen Konformation; die genaue Position und Ausrichtung der GLYGNG-Sequenz, der 157-Schleife und des D129 sind dabei wenig konserviert und unterscheiden sich von Struktur zu Struktur. Besonders die im Vergleich zur geschlossenen Konformation unterschiedliche Positionierung der GLYGNG-Sequenz und der 157-Schleife wird als Ursache für die fehlende bzw. niedrige Aktivität der offenen Konformation angesehen.¹²⁸ G₄SG₄-verknüpfte Konstrukte neigen stärker dazu, in der offenen Konformation zu kristallisieren, als binäre Konstrukte. Die Anwesenheit substratanaloger Liganden

führt dagegen zu einer Bevorzugung der geschlossenen Konformation. In NMR-Studien mit der DENV-, der WNV- und der ZIKV-Protease wurde gezeigt, dass in Lösung vorwiegend die geschlossene Konformation vorliegt.^{120-121,123-124,129-131}

Der hohe Konservierungsgrad der Primär-, der Sekundär- und Tertiärstruktur macht Flavivirin zu einem potentiellen Target für die Entwicklung pan-antiflaviviraler Wirkstoffe.

1.2.2 Inhibitoren des Flavivirins

1.2.2.1 Kompetitive Inhibitoren: Peptide und Peptidderivate

Bei der Mehrzahl der im Folgenden beschriebenen Verbindungen handelt es sich um Inhibitoren der DENV-, WNV- oder ZIKV-Protease. Für Inhibitoren der JEV-, der YFV- und der TBEV-Protease sind nur einige wenige Beispiele bekannt. Dies ist sicherlich auch mit der Verfügbarkeit von effektiven und sicheren Impfstoffen gegen das Japanische-Enzephalitis-, das Gelbfieber- und das FSME-Virus zu begründen.

Der erste Ansatz zur Entwicklung von Flavivirininhibitoren war die Adressierung des aktiven Zentrums. Da Flavivirin Substrate bevorzugt hinter multibasischen Sequenzen spaltet, ist es nicht verwunderlich, dass die ersten beschriebenen Flavivirininhibitoren Peptide bzw. Peptidderivate mit einer di- oder tribasischen P3-P1-Sequenz sind. Im Allgemeinen bringt der Einsatz von Peptiden als Wirkstoff verglichen mit kleinen, organischen Molekülen mehrere Vor- und Nachteile mit sich. Nachteilig sind die geringe Membranpermeabilität, die der hohen molaren Masse und dem hydrophilen Charakter von Peptiden geschuldet ist, und der schnelle enzymatische Abbau sowie die rasche Eliminierung *in vivo*. Daraus resultieren in der Regel eine niedrige orale Verfügbarkeit bzw. eine niedrige Absorptionsrate und eine kurze Halbwertszeit. Des Weiteren erschwert die geringe Membranpermeabilität die Adressierung intrazellulärer Targets wie Flavivirin, weshalb die Mehrheit der für den klinischen Gebrauch zugelassenen peptidischen Wirkstoffe extrazelluläre oder an der Zelloberfläche lokalisierte Targets adressiert. Ansätze zur Umgehung oder Aufhebung dieser Nachteile sind die Cyclisierung, der Einbau D-konfigurierter oder nicht-natürlicher Aminosäuren und die synthetische Modifizierung des Peptidrückgrats oder der Peptidseitenketten.¹³² Tabelle 1.2 fasst auf den folgenden zwei Seiten die wichtigsten Peptide und Peptidderivate mit kompetitiver Hemmwirkung auf das Flavivirin zusammen (eine herausnehmbare Kopie dieser Tabelle befindet sich innen im hinteren Einband).

Tabelle 1.2 Peptide und Peptidderivate mit kompetitiver Hemmwirkung auf Flavivirin. Eine herausnehmbare Kopie dieser Tabelle befindet sich innen im hinteren Einband.

Nr.	Spezies	Proteasehemmung <i>in vitro</i> ^a	Hemmung der Virus- vermehrung <i>in cellulo</i> ^a	Struktur	Referenz
2	DENV2	$K_i = 16$	–	s. Abb. 1.8, S.19	117
3	DENV2	$K_i = 12,1$	–	s. Abb. 1.8, S.19	133
4a	DENV2	$K_i > 500$	–	s. Abb. 1.8, S.19	134-135
4b	DENV2	$K_i = 128$	–	s. Abb. 1.8, S.19	134-135
4c	WNV	$K_i = 4,10$	–	s. Abb. 1.8, S.19	114,134-136
	DENV2	$K_i = 5,8$	–		
4d	YFV	$K_i = 0,40$	–	s. Abb. 1.8, S.19	114,134-136
	WNV	$K_i = 0,30$	–		
	DENV2	$K_i = 0,70$	–		
4e	YFV	$K_i = 0,38$	–	s. Abb. 1.8, S.19	114,134-136
	WNV	$K_i = 0,03$	–		
5	DENV2	$K_i = 0,043$	–	s. Abb. 1.8, S.19	114,134-136
	YFV	$K_i = 0,05$	–		
6	ZIKV	$IC_{50} = 0,21$	–	s. Abb. 1.8, S.19	137-138
	WNV	$IC_{50} = 0,17$	–		
7	ZIKV	$K_i = 0,040$	–	s. Abb. 1.8, S.19	139
	WNV	$K_i = 0,82$	–		
8a	DENV2	$K_i = 0,051$	–	s. Abb. 1.8, S.19	140
	WNV	$K_i = 0,4$	–		
8b	WNV	$K_i = 0,009$	$IC_{50} = 1,6$ (Plaque)	s. Abb. 1.9, S.20	141
8c	WNV	$K_i = 0,006$	–	s. Abb. 1.9, S.20	141
8d	WNV	$K_i = 4,7$	–	s. Abb. 1.9, S.20	142
8e	WNV	$K_i = 2,6$	–	s. Abb. 1.9, S.20	143
8f	WNV	$K_i = 0,13$	–	s. Abb. 1.9, S.20	144
	ZIKV	–	72 % (12,5 μ M 8f)		
	DENV2	–	100 % (12,5 μ M 8f)		
9a	ZIKV	–	78 % (12,5 μ M 8f)	s. Abb. 1.9, S.20	145
9b	ZIKV	$IC_{50} = 3,6$	–	s. Abb. 1.9, S.20	146
9c	ZIKV	$IC_{50} = 3,9$	–	s. Abb. 1.9, S.20	146
10	ZIKV	$IC_{50} = 0,45$	–	s. Abb. 1.9, S.20	146
	ZIKV	$IC_{50} = 1,1$	–		
11a	WNV	$K_i = 0,82$	–	s. Abb. 1.10, S.21	149
	DENV2	$K_i = 1,22$	–		
	DENV1	$K_i = 0,4$	–		
	DENV2	$K_i = 0,3$	–		
11b	DENV3	$K_i = 0,5$	–	s. Abb. 1.10, S.21	149
	DENV4	$K_i = 2,2$	–		
	DENV1	$K_i = 9,0$	–		
	DENV2	$K_i = 18,0$	–		
11c	DENV3	$K_i = 75,1$	–	s. Abb. 1.10, S.21	149
	DENV4	$K_i = 55,9$	–		

^aAlle Werte in [μ M], sofern nicht anders angegeben.

Tabelle 1.2 (Fortsetzung)

Nr.	Spezies	Proteasehemmung <i>in vitro</i> ^a	Hemmung der Virus- vermehrung <i>in cellulo</i> ^a	Struktur	Referenz
12a	DENV2	$K_i = 4,9$	$EC_{50} = 38,7; CC_{50} > 100$	s. Abb. 1.10, S.21	150
12b	DENV2	–	$EC_{50} = 39,4; CC_{50} > 100$	s. Abb. 1.10, S.21	151
13a	WNV	8 % (50 μ M 13a)	–	s. Abb. 1.11, S.23	152
	DENV2	$K_i = 15,6$	–		
13b	WNV	52 % (50 μ M 13b)	–	s. Abb. 1.11, S.23	153
	DENV2	$K_i = 1,8 / K_i' = 7,9$	–		
13c	WNV	98 % (50 μ M 13c)	–	s. Abb. 1.11, S.23	154
	DENV2	$K_i = 0,14$	–		
13d	WNV	70 % (50 μ M 13d)	–	s. Abb. 1.11, S.23	155
	DENV2	$K_i = 0,4$	–		
13e	ZIKV	$IC_{50} = 0,25$	–	s. Abb. 1.11, S.23	156
	WNV	$IC_{50} = 0,56$	$EC_{50} = 15,6$		
	DENV2	$IC_{50} = 0,176$	$EC_{50} = 3,28$		
	TBEV	$IC_{50} = 0,97$	–		
13f	WNV	$K_i = 0,012$	–	s. Abb. 1.11, S.23	156
	DENV2	$K_i = 0,039$	–		
13g	WNV	61 % (50 μ M 13g)	–	s. Abb. 1.11, S.23	157
	DENV2	$IC_{50} = 2,5$	$EC_{50} = 4,1$		
13h	WNV	$IC_{50} = 13$	–	s. Abb. 1.11, S.23	158
	DENV2	$IC_{50} = 11$	$EC_{50} = 0,9; CC_{50} > 50$		
13i	DENV2	–	$EC_{50} = 0,24; CC_{50} > 100$	s. Abb. 1.11, S.23	159
14	WNV	$K_i = 0,16 / 0,09$	–	Aprotinin s. Abb. 1.12, S.25	160-161
	DENV1	$K_i = 0,045$	–		
	DENV2	$K_i = 0,026 / 0,04$	–		
	DENV3	$K_i = 0,025$	–		
	DENV4	$K_i = 0,021$	–		
15	DENV2	$IC_{50} = 11,7$	Hemmung ^b	Protegrin-1 s. Abb. 1.12, S.25	162
16a	DENV2	$K_i = 2,2$	–	s. Abb. 1.12, S.25	163
16b	DENV2	$K_i = 42,0$	–	s. Abb. 1.12, S.25	163
17	DENV3	$K_i = 2,9$	–	s. Abb. 1.12, S.25	164
18	ZIKV	$K_i = 0,64$	–	s. Abb. 1.12, S.25	112
19a	DENV2	$IC_{50} = 0,95$	–	s. Abb. 1.12, S.25	165
19b	DENV2	$IC_{50} = 2,0$	$EC_{50} = 2,0; CC_{50} = 24$	s. Abb. 1.12, S.25	165
20	ZIKV	$IC_{50} = 15,0$	–	s. Abb. 1.13, S.26	166-167
	WNV	$K_i = 12,0$	–		
21	ZIKV	$IC_{50} < 1$	–	s. Abb. 1.13, S.26	168
	WNV	$IC_{50} < 1$	–		

^aAlle Werte in [μ M], sofern nicht anders angegeben; ^bkein Zahlenwert wurde nicht angegeben.

Die multibasischen Flavivirininhibitoren können nur in unzureichendem Maße durch Membranen diffundierenden, wodurch in der Regel eine geringe intrazelluläre Wirksamkeit dieser Verbindungen resultiert. Dem gegenüber steht, dass mit peptidischen Strukturen bei initialen Studien häufig höhere Affinitäten zum Target und damit einhergehend stärkere Selektivitäten erreicht werden als mit kleinen Molekülen. Peptidische Wirkstoffe können auch zur Hemmung von Protein-Protein-Interaktionen (PPI) und zur Bindung an schwer adressierbare Targets genutzt werden. Vor diesem Hintergrund lässt sich die große Zahl peptidischer Inhibitoren mit hoher Affinität zum Flavivirin ($K_i < 1 \mu\text{M}$) verstehen. Trotz der hohen Hemmwirkung ist die antivirale Wirksamkeit dieser Peptide in zellbasierten Assays wegen der oben angesprochenen Ursachen gering.¹⁶⁹⁻¹⁷³

Der Hexapeptid-aldehyd **2** und das Hexapeptidamid **3**, die zu den ersten beschriebenen Flavivirininhibitoren gehören, hemmen die DENV2-Protease mit K_i -Werten von 16 bzw. 12 μM (Abb. 1.8).^{117,133} Von Novartis wurde 2006 eine Reihe von Derivaten des Tetrapeptids Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-OH (**4a**), das selbst keine nennenswerte Hemmwirkung besitzt, beschrieben: Durch Einbau eines C-terminalen Argininamids (**4b**) oder kovalent bindender Gruppen wie einem Aldehyd (**4c**), einem Trifluormethylketon (**4d**) oder einer Boronsäure (**4e**) konnte die Wirksamkeit deutlich gesteigert werden. Die höchsten Affinitäten mit K_i -Werten im zweistelligen nanomolaren Bereich für die DENV2-, die WNV- und die YFV-Protease wurden für das Boroarginin-Derivat **4e** bestimmt.^{134,174}

Die Novartis-Gruppe zeigte in Studien mit der DENV2-¹³⁵ und der YFV-Protease¹³⁶ mit vom Arginal-Derivat **4c** abgeleiteten Inhibitoren außerdem, dass die Substitution des P2-Arginins oder P1-Arginals durch Alanin bzw. Alaninaldehyd zu einem Affinitätsverlust im Bereich mehrerer Größenordnungen führt, während eine Substitution durch Lysin bzw. Lysinaldehyd die Affinität nur um einen Faktor < 10 senkt. Die P2-Substitutionen führen dabei zu einem deutlich höheren Affinitätsverlust als die P1-Substitutionen. Hinsichtlich der Substitution des P2- oder P1-Rests durch Phenylalanin bzw. den entsprechenden Aldehyd unterscheiden sich die DENV2- und YFV-Protease: Bei der DENV2-Protease wurden ähnliche Ergebnisse wie bei Substitutionen mit Lysin erzielt, während die Affinität zur YFV-Protease durch den Einbau des Phenylalanins absinkt. Grundsätzlich gelten für die WNV-Protease ähnliche Tendenzen wie für die DENV2- und die YFV-Protease.¹¹⁴ Abweichend führt der Austausch des P2-Arginins gegen ein Lysin bei der WNV-Protease zu einer Affinitätssteigerung. Die Autoren geben ebenfalls an, dass der Austausch des P1-Arginals gegen Alaninaldehyd nahezu keinen Einfluss auf die Affinität habe, was mit Hinblick auf die Ergebnisse der Arbeiten zur DENV2- und zur YFV-Protease und der allgemeinen Substratspezifität des Flavivirins eine erstaunliche Erkenntnis ist, bisher aber nicht überprüft oder widerlegt wurde. Für die DENV2-, die WNV- und die YFV-Protease gilt gleichermaßen, dass Substitutionen in P3- oder P4-Position deutlich besser toleriert werden als in P1- oder P2-Position.

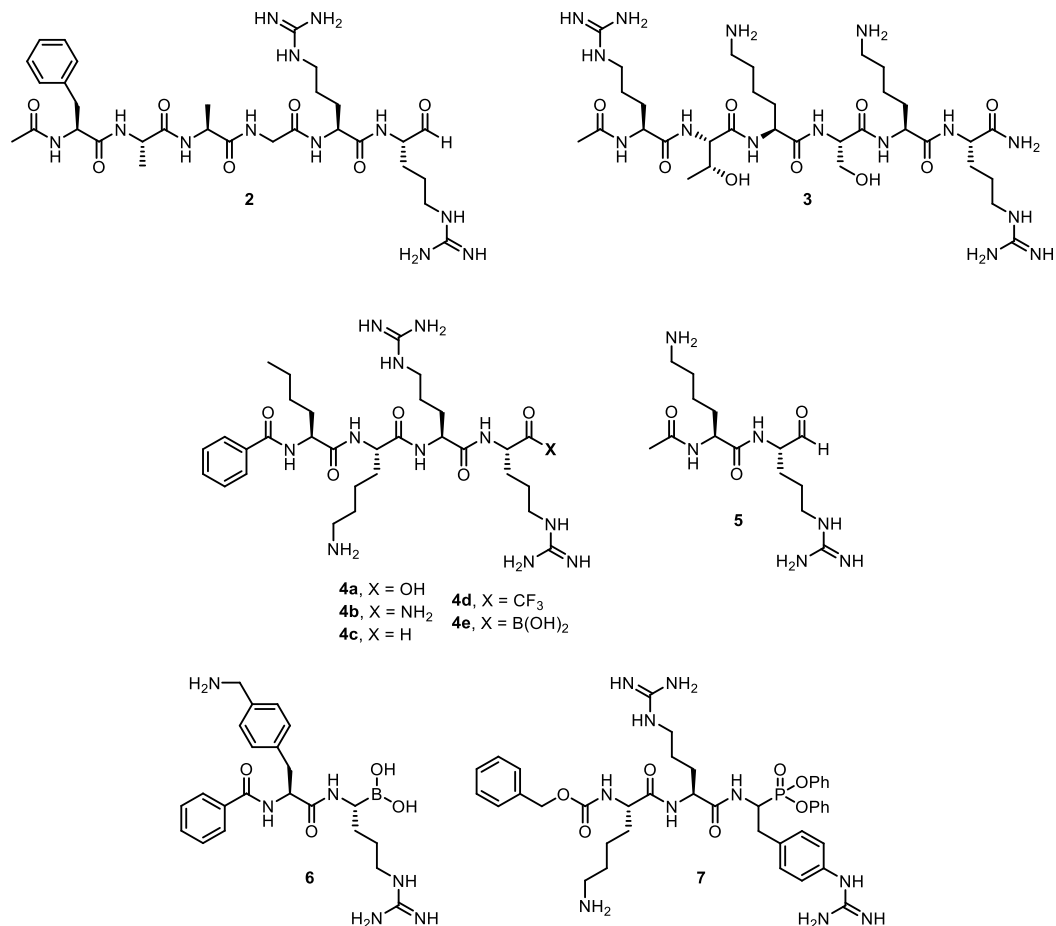


Abbildung 1.8 Erste peptidische Inhibitoren des Flavivirins (**2** und **3**) und peptidische Inhibitoren mit kovalentem *war-head* (**4a** bis **4e**, **5** bis **7**). Die zugehörigen Hemmwerte sind Tabelle 1.2 (S.16) zu entnehmen.

Dass auch Dipeptide potente Inhibitoren der WNV- und der ZIKV-Protease sein können, zeigen die Verbindungen **5** und **6**, die ähnlich hohe Hemmwirkungen wie die tribasischen Verbindungen **4c-e** besitzen.¹³⁷⁻¹³⁹ Die Verbindungen **4c-e**, **5** und **6** binden reversibel kovalent an das S135 der katalytischen Triade. Einige Phosphonatinhibitoren, die irreversibel-kovalent an das S135 binden, wurden von OLEKSYSZYN *et al.* beschrieben.¹⁴⁰ Die Hemmkonstanten dieser Verbindungen, auch der wirksamsten Verbindung dieser Serie (**7**), liegen deutlich höher als die der reversibel-kovalenten Inhibitoren.

Ausgehend von Arginal synthetisierte die Gruppe um STOERMER die Verbindungen **8a** und **8b**, die die WNV-Protease mit K_i -Werten < 10 nM hemmen (Abb. 1.9, S.20).¹⁴¹ Die Autoren demonstrierten außerdem die Präferenz der WNV-Protease für Lysin als P3- und P2-Rest und für Phenyllessigsäurederivate als N-terminalen Acylrest. Die niedrige Hemmwirkung der Verbindung **8a** in Zellkultur führten die Autoren auf die geringe Membranpermeabilität zurück.

Auf Basis der Verbindungen **8a** und **8b** entwickelte die Gruppe um BRIAN CHIA Inhibitoren mit Agmatin (decarboxyliertes Arginin) in P1-Position (**8c-d**).¹⁴²⁻¹⁴³ Die Affinität dieser Verbindungen zur WNV-Protease ist zwei bis drei Größenordnungen geringer als die ihrer Arginal-Analoga. Aufbauend auf diese Agmatinderivate gelang STEINMETZER *et al.* die Entwicklung von Inhibitoren mit Hemmkonstanten

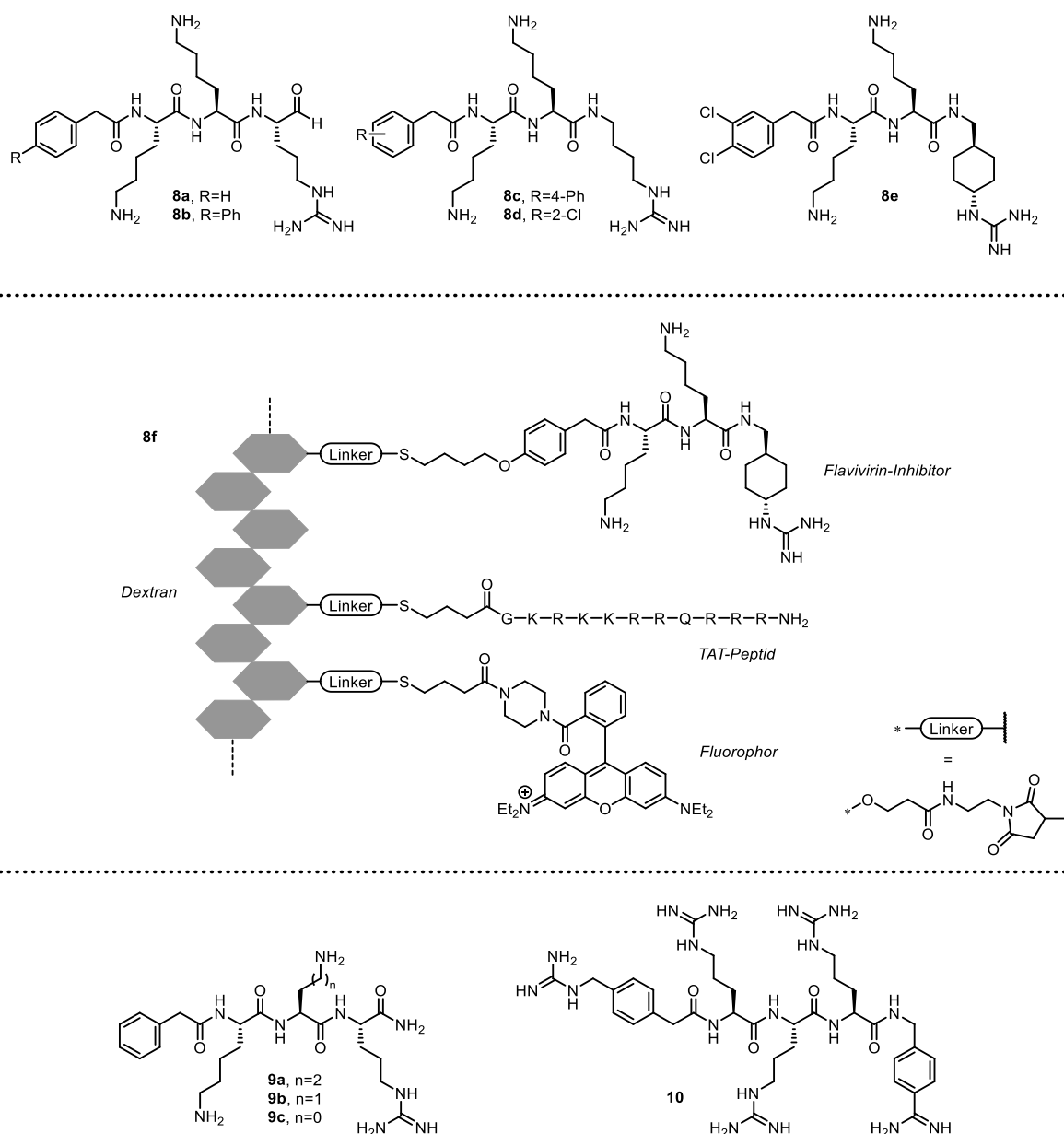


Abbildung 1.9 Peptidische Inhibitoren der WNV- und ZIKV-Protease mit Lys-Lys-Arg als P3-P1-Segment und davon abgeleitete Strukturen sowie der chimärische Furin- und Flavivirininhibitor **10**. Die zugehörigen Hemmwerte sind Tabelle 1.2 (S.16) zu entnehmen.

im niedrigen dreistelligen nanomolaren Bereich. Bei diesen Inhibitoren wurde das Agmatin-Analogon *trans*-(4-Guanidino)cyclohexylmethylamid (GCMA) als P1-Rest verwendet.¹⁴⁴ Trotz starker Affinität *in vitro* konnte für die Verbindung **8e** keine Wirksamkeit in Zellkultur festgestellt werden.¹⁴⁷ RADEMANN *et al.* entwickelten Nanopartikel-Strukturen wie die Verbindung **8f**, die die Vermehrung des Dengue-2-, des West-Nil- und des Zika-Virus in Zellkultur hemmen.¹⁴⁵ Die Autoren nutzten dabei Dextran als Grundgerüst und verknüpften dieses kovalent mit einer vom Inhibitor **8e** abgeleiteten Struktur, mit einer zellpenetrierenden Aminosäuresequenz aus dem TAT-Protein und einem Fluorophor (zur Untersuchung der Zellpermeabilität). Besonders das Dengue-2-Virus wurde *in cellulo* mit einer

$EC_{50} < 0,1 \mu\text{M}$ erfolgreich gehemmt. Im Rahmen einer SAR-Studie zu peptidischen ZIKV-Proteaseinhibitoren nutzten ONTORIA *et al.* das Phac-Lys-Lys-Arg-Motiv der Verbindungen **8a** und **8b** als Basis für die Entwicklung der Inhibitoren **9a-c**.¹⁴⁶ Bemerkenswert ist die Erkenntnis, dass innerhalb dieser Serie der Einbau von L-2,4-Diaminobuttersäure als P2-Rest (**9c**) zu einer etwa 8-fach höheren Affinität zur ZIKV-Protease führt als der Einbau von Ornithin (**9b**) oder Lysin (**9a**). Ein weiterer, in der Gruppe STEINMETZER entwickelter Inhibitor ist die Verbindung **10**.¹⁴⁷⁻¹⁴⁸ Dieser entstammt einer Serie von Verbindungen, die sowohl Flavivirin als auch Furin ($K_i = 4,48 \times 10^{-5} \mu\text{M}$) hemmen. Für diese Inhibitor-Chimären wurde ein antiviraler Effekt in Zellkultur beobachtet, welcher den Autoren zufolge jedoch im Wesentlichen auf die Hemmung des Furins zurückzuführen ist.

Inhibitoren wie das Peptid **11a**, die Teil einer Serie von Oktapeptiden mit einer Arg₄-Sequenz als P4-P1-Segment sind, zeigen Hemmwirkungen mit K_i -Werten im einstellig mikromolaren oder submikromolaren Bereich auf die Proteasen aller vier DENV-Serotypen (Abb. 1.10). Besonderes Augenmerk legten die Autoren auf die C-terminal der Schnittstelle gelegene S1'-S4'-Region. Durch sukzessive Optimierung wurde mit dem Tetrapeptid **11b** eine nicht-basische Verbindung mit moderater Hemmwirkung identifiziert. Die Autoren postulieren allerdings, dass die Verbindung **11b** anders als **11a** nicht an die S1'-S4'-Region bindet, sondern im aktiven Zentrum mit der katalytischen Triade interagiert.¹⁴⁹ Das hydrophobe Dipeptid **12a** und der von diesem abgeleitete, nicht-peptidische Bicyclus **12b** binden Docking-Ergebnissen zufolge ebenfalls ins aktive Zentrum. Sowohl **12a** als auch **12b** zeigen eine hemmende Wirkung auf das Dengue-2-Virus in Zellkultur.¹⁵⁰⁻¹⁵¹

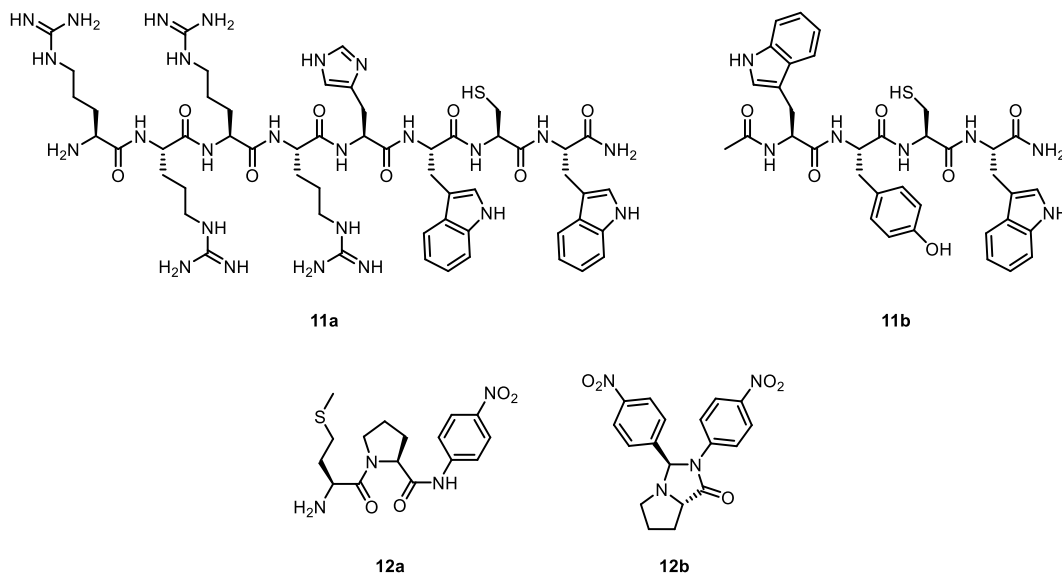


Abbildung 1.10 Peptidomimetische Inhibitoren der DENV-Protease. Die Verbindungen **11a**, **12a** und **12b** adressieren die S1'-S4'-Region; **11b** wurde vom Peptid **11a** abgeleitet, bindet Docking-Ergebnissen zufolge aber an die katalytische Triade. Die zugehörigen Hemmwerte sind Tabelle 1.2 (S.16-17) zu entnehmen.

Durch „Umdrehen“ der gewöhnlichen Substratsequenz entwickelten KLEIN *et al.* das Peptid **13a**, ein sogenanntes Retropeptid, das als Ausgangspunkt für die in Abbildung 1.11 gezeigte Optimierungsserie diente.¹⁵² Die Verbindung **13a** hemmt die DENV2-Protease mit einem K_i von 15.6 μM und besitzt auch eine, wenn auch schwächere, Hemmwirkung auf die WNV-Protease. In Zellkultur zeigt die Verbindung wegen ihrer niedrigen Membranpermeabilität keinen Effekt auf die Virusvermehrung.¹⁶⁴ Durch Einführung von Thiazolidindion-Derivaten in die *N*-terminale Acylgruppe (Inhibitor **13b**) konnte einerseits die Affinität zum Flavivirin *in vitro*, andererseits auch die Hemmung der Virusvermehrung in Zellkultur gesteigert werden.¹⁵³ Docking-Experimenten mit dem Inhibitor **13b** und der DENV2-Protease zufolge bindet das Lysin in die S1- und das Arginin in die S2-Tasche. Die *N*-terminale Arylidengruppe besetzt den hydrophoben Teil des S3/4-Bereichs um die Reste V154 und V155; das *C*-terminale Norleucinamid liegt in der S1'-Tasche. Der Austausch des P1'-Norleucinamids gegen ein Phenylglycinamid (Inhibitor **13c**) führte zu submikromolaren Hemmkonstanten.¹⁵⁴ Die Autoren postulieren für diese Verbindung eine Änderung des Bindungsmodus: Anders als beim Inhibitor **13b** sollen hier Lysin und Arginin die S2-Tasche bzw. den S3/4-Bereich besetzen, während das Phenylglycin-Amid die S1-Tasche adressiert. Eine gewisse Affinität zu nicht-basischen, aromatischen P1-Resten wurde bereits von KELLER *et al.* beschrieben.¹³⁵ Im Zuge der Untersuchung von Phenylglycin- und Phenylalanin-Derivaten als Arginin-Mimetika wurde der Inhibitor **13d** synthetisiert, der die DENV2-Protease *in vitro* im submikromolaren Bereich hemmt, aber fast keine antivirale Wirksamkeit *in cellulo* besitzt.¹⁵⁵ Eine deutlich erhöhte Aktivität in Zellkultur wurde durch Austausch des P1-Phenylglycinamids gegen ein substituiertes Benzyloxyphenylglycinamid erzielt (Inhibitor **13e**).¹⁵⁶ Wie beim Inhibitor **13c** bindet die Seitenkette des Phenylglycin-Derivats in die S1-Tasche; die Benzyloxygruppe ist dabei in Richtung der hydrophoben Seitenkette des V155 (bzw. I155 bei der WNV-Protease) orientiert und sorgt über π - σ -Wechselwirkung für die im Vergleich zu **13c** erhöhte Affinität. Die Verbindung **13f** zeigt *in vitro* zur DENV2- ($K_i = 12 \text{ nM}$) und zur WNV-Protease ($K_i = 39 \text{ nM}$) eine etwa zehnfach höhere Affinität als **13e**, womit **13f** der potenteste Flavivirininhibitor der Optimierungsserie ist. Allerdings zeigt **13f** wegen seiner niedrigen Membranpermeabilität keine Hemmwirkung in Zellkultur. Eine Aktivität *in cellulo* im mikromolaren Bereich zeigt dagegen der von DRAŽIĆ *et al.* entwickelte Inhibitor **13g** mit einem *C*-terminalen β -Lactam.¹⁵⁷ Durch Identifizierung enzymatischer Spaltprodukte konnten die Autoren zeigen, dass das S135 aus der katalytischen Triade nicht nur am β -Lactam, sondern auch *C*-terminal am Lysin angreift, was zur Spaltung des Inhibitors führt. Entsprechend postulierten sie zwei verschiedene Bindungsmodi für die Verbindung **13g**. Eine Steigerung der Aktivität in Zellkultur zu submikromolaren EC_{50} -Werten wurde durch Verringerung des peptidischen Charakters, wie bei den Phenylglycin-Derivaten **13h** und **13i**, erzielt.¹⁵⁸⁻¹⁵⁹ Docking-Experimente mit **13h** legen anders als bei **13c** und **13d** das Benzyloxyphenylglycin in die S2-Tasche, während die *C*-terminale Guanidinogruppe mit der Seitenkette des D129 in der S1-Tasche interagiert und die *N*-terminale Alkylkette über V154 und V155 im S3/4-Bereich liegt. Bemerkenswert ist die hohe Hemmwirkung des nicht-basischen Inhibitors **13i** *in*

cellulo. Da der Bindungsmodus von **13i** ungeklärt ist und keine signifikante Hemmwirkung mit der isolierten Protease in enzymkinetischen Messungen festgestellt wurde, ist es allerdings fraglich, ob Flavivirin tatsächlich das Target dieses Inhibitors ist.

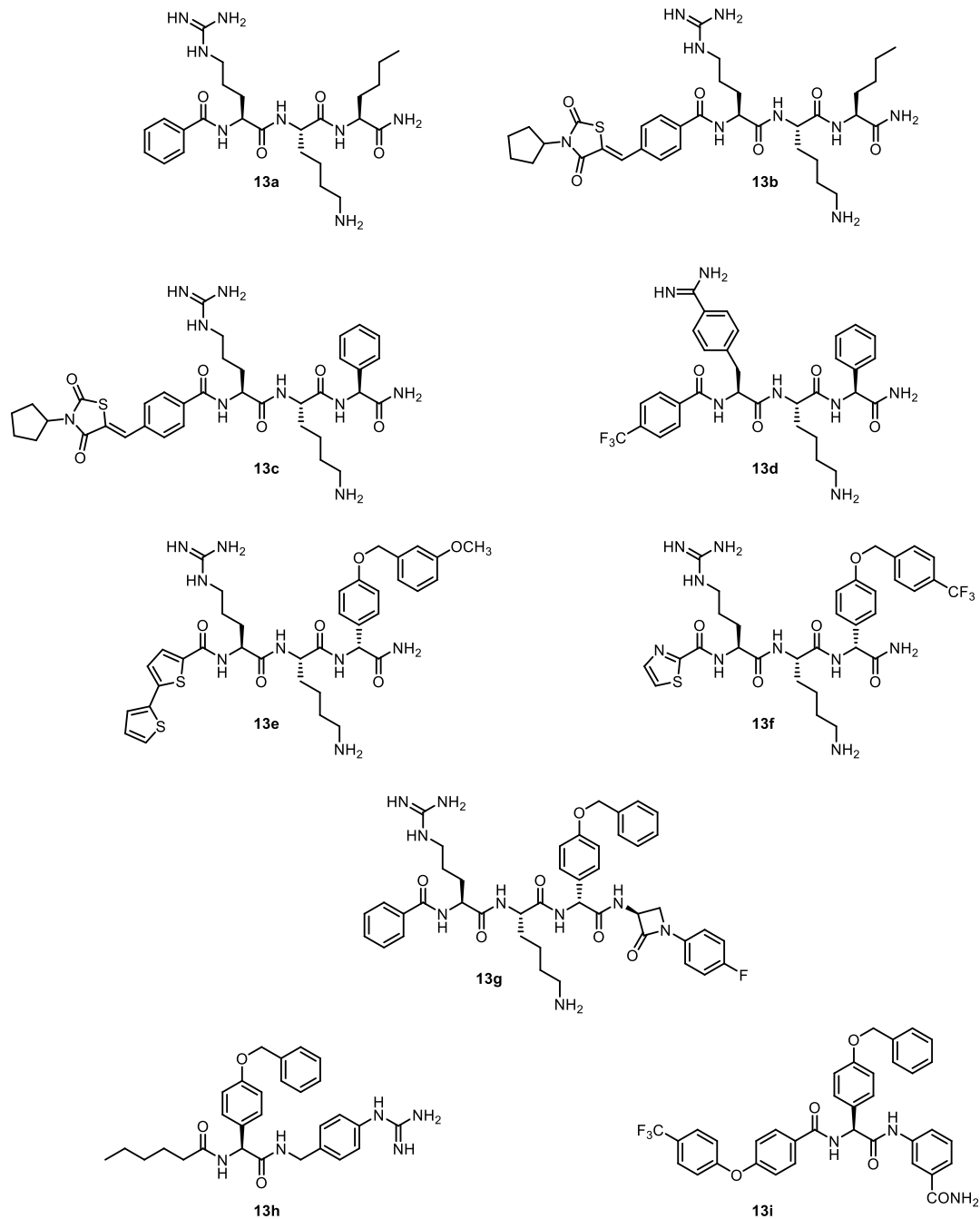


Abbildung 1.11 Optimierungsserie von DENV2-Inhibitoren nach KLEIN *et al.* Ansatzpunkt der Optimierungsserie war das Retropeptid **13a**, das in Zellkultur inaktiv gegen DENV2 ist. Durch sukzessive Optimierung wurde der in Zellkultur potente, nicht-basische Inhibitor **13i** entwickelt. Die zugehörigen Hemmwerte sind Tabelle 1.2 (S.17) zu entnehmen.

Es sind nur wenige cyclische Peptide oder Peptidderivate mit hemmender Wirkung auf das Flavivirin beschrieben (Abb. 1.12). Ein wirksamer Inhibitor ist der bovine pankreatische Trypsininhibitor (BPTI, **14**), der auch unter dem Namen Aprotinin bekannt ist.^{117,160-161} Aprotinin ist ein natürliches Polypeptid mit drei verbrückenden Disulfidbindungen. Aprotinin hemmt die WNV-Protease und die Protease aller DENV-Serotypen im submikromolaren Bereich. Aprotinin ist eine der ersten Verbindungen überhaupt, für die eine Hemmwirkung auf Flavivirin beschrieben wurde. Ebenfalls natürlichen Ursprungs ist das Protegrin-1 (**15**), das aus porcinen Leukozyten isoliert wurde. Es ist wie Aprotinin reich an Argininresten und über Disulfidbrücken verknüpft. Es hemmt sowohl die DENV2-Protease *in vitro* als auch die DENV2-Vermehrung *in cellulo*.¹⁶²

Die Gruppe um WANG leitete von im Gift des Marmorkegels (*Conus marmoreus*) vorhandenen Peptiden das cyclische Peptid **16a** mit Lys–Arg–Lys als mutmaßlichem P3-P1-Segment ab.¹⁶³ Dieses Peptid hemmt die DENV2-Protease im mikromolaren Bereich und ist dabei etwa 20-fach wirksamer als sein lineares Analogon **16b**. Bei diesem Vergleich dürfen allerdings die *N*-terminale Amino- und die *C*-terminale Carbonsäuregruppe, die im Makrocyclus **16a** nicht vorhanden sind, nicht außer Acht gelassen werden. Daher ist es fraglich, ob der Faktor 20 allein auf die Konformationsstabilisierung zurückzuführen ist oder nicht die beiden geladenen Endgruppen der linearen Verbindung **16b** die Interaktion mit der Protease stören. Als Folge seiner niedrigen Membranpermeabilität zeigt der Makrocyclus **16a** keine antivirale Aktivität in Zellkultur.¹⁶⁴

Ausgehend von der Aminosäuresequenz des Aprotinins wurde der cyclische Inhibitor **17** entwickelt.¹⁷⁵ Dabei wurden die zwei Abschnitte des Aprotinins, die ins aktive Zentrum binden, einerseits über eine Peptidbindung und andererseits über eine Disulfidbrücke zwischen den zwei Cysteinresten (wie sie im WT-Aprotinin ebenfalls vorhanden ist) verknüpft. Durch Optimieren der so erhaltenen Sequenz wurde der Inhibitor **17** mit einer Hemmkonstanten von 2,9 μM entwickelt. Unter Nutzung des identischen P3-P1-Segments (Lys–Arg–Lys) wie im Inhibitor **16a** entwickelten NITSCHKE *et al.* die Verbindung **18** als Inhibitor der ZIKV-Protease und YOSHIDA *et al.* die Verbindung **19a** als Inhibitor der DENV2-Protease.^{112,165} Da der Makrocyclus **19a** trotz dem niedrigen K_i -Wert die DENV2-Vermehrung in Zellkultur nicht hemmt, übertrugen die Autoren den von PEI beschriebenen Aufbau cyclischer zellpenetrierender Peptide¹⁷⁶⁻¹⁷⁷ auf ihre Inhibitoren. Die zellpenetrierenden Peptide nach PEI bestehen aus einem Oligo-Arginin-Segment (i.d.R. Arg₃ oder Arg₄), das mit einem Segment aus hydrophoben Aminosäuren verknüpft ist. Der durch Adaption dieses Aufbaus erhaltene Inhibitor **19b** hemmt die DENV2-Protease *in vitro* und *in cellulo* im einstellig mikromolaren Bereich. Problematisch ist bei diesem zellpenetrierenden Peptid die vergleichsweise hohe Cytotoxizität.

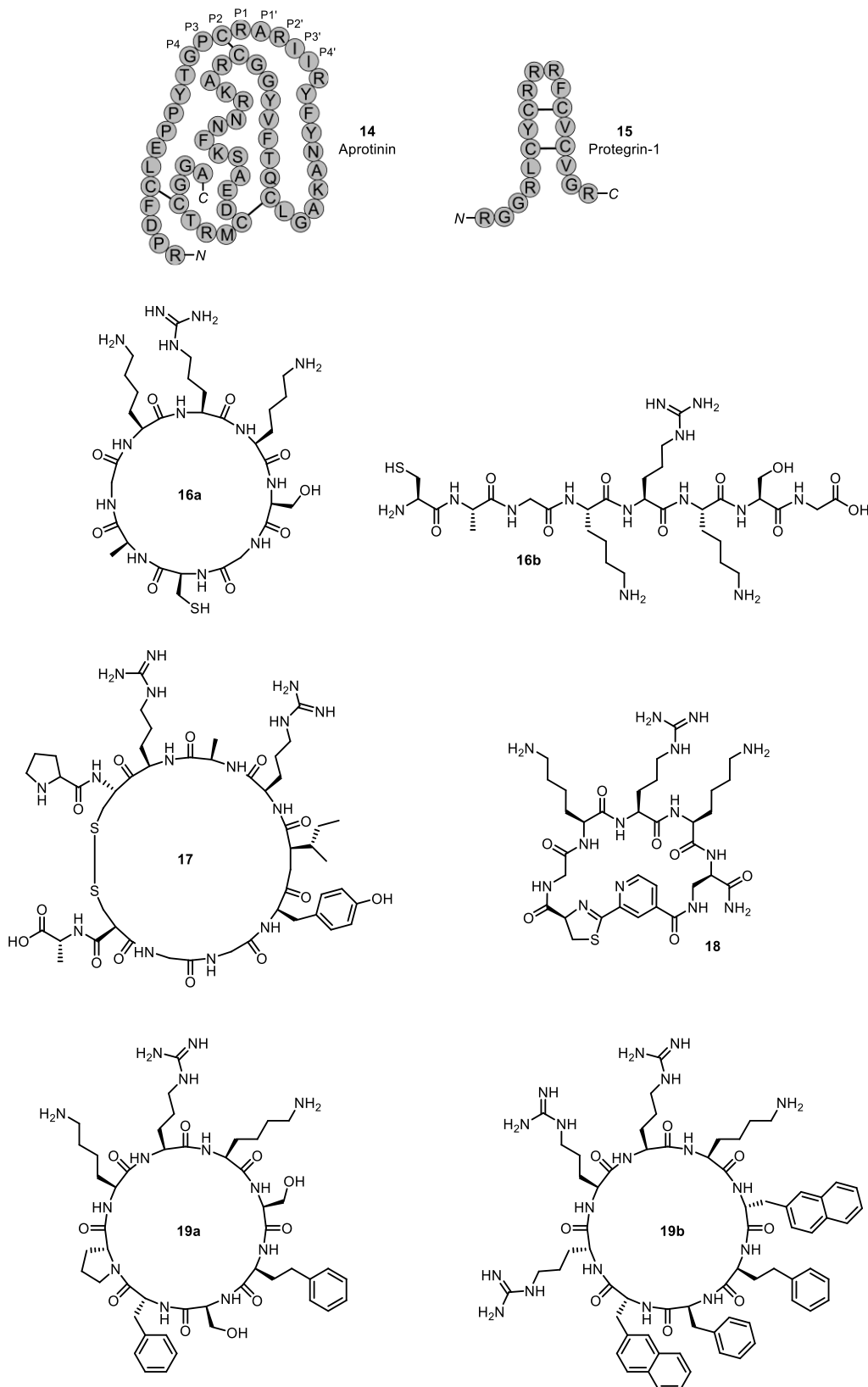


Abbildung 1.12 Cyclische Peptide mit kompetitiver Hemmwirkung auf Flavivirin. **16b** ist das lineare Analogon des cyclischen Peptids **16a**. Die zugehörigen Hemmwerte sind Tabelle 1.2 (S.17) zu entnehmen.

Kupfer(II)-Peptid-Komplexe wie **20** (Abb. 1.13), die von der Gruppe COWAN entwickelt wurden, hemmen die WNV- und die ZIKV-Protease kompetitiv über eine Lys–Arg–D-Phg-Sequenz, die bereits von der Gruppe KLEIN eingesetzt wurde (vgl. Abb. 1.11, S.23).¹⁶⁶⁻¹⁶⁷ Gleichzeitig oxidieren jene Komplexe mehrere Reste im aktiven Zentrum, was zur irreversiblen Deaktivierung der proteolytischen Aktivität des Flavivirins führt. Ein weiterer Peptid-Metall-Komplex wurde von NITSCHKE *et al.* beschrieben.¹⁶⁸ Dabei setzten die Autoren das aus cyclischen Flavivirininhibitoren bekannte Lys–Arg–Lys-Segment gleich zweimal ein. Über die Thiolgruppen dreier Cysteine wird ein Bismut(III)-Atom komplexiert. Die so erhaltenen, bicyclischen Komplexe wie **21** sind stabil und zeigen verglichen mit bismutfreien Peptiden verbesserte Eigenschaften im Sinne der Flavivirinhemmung.

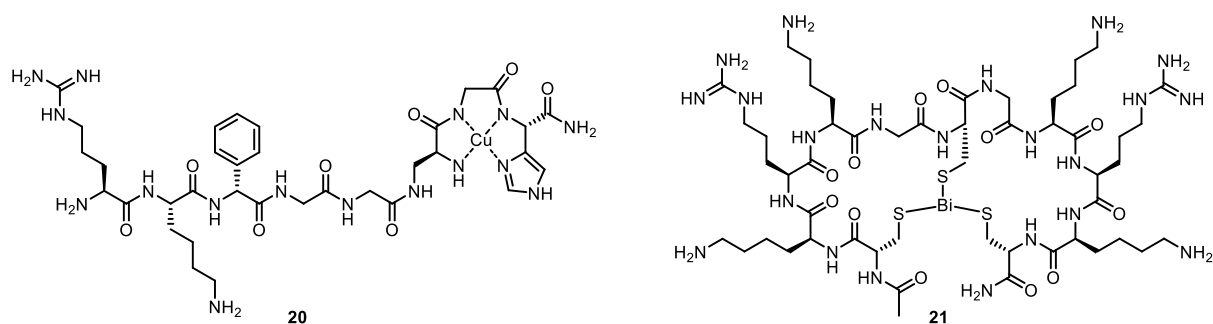
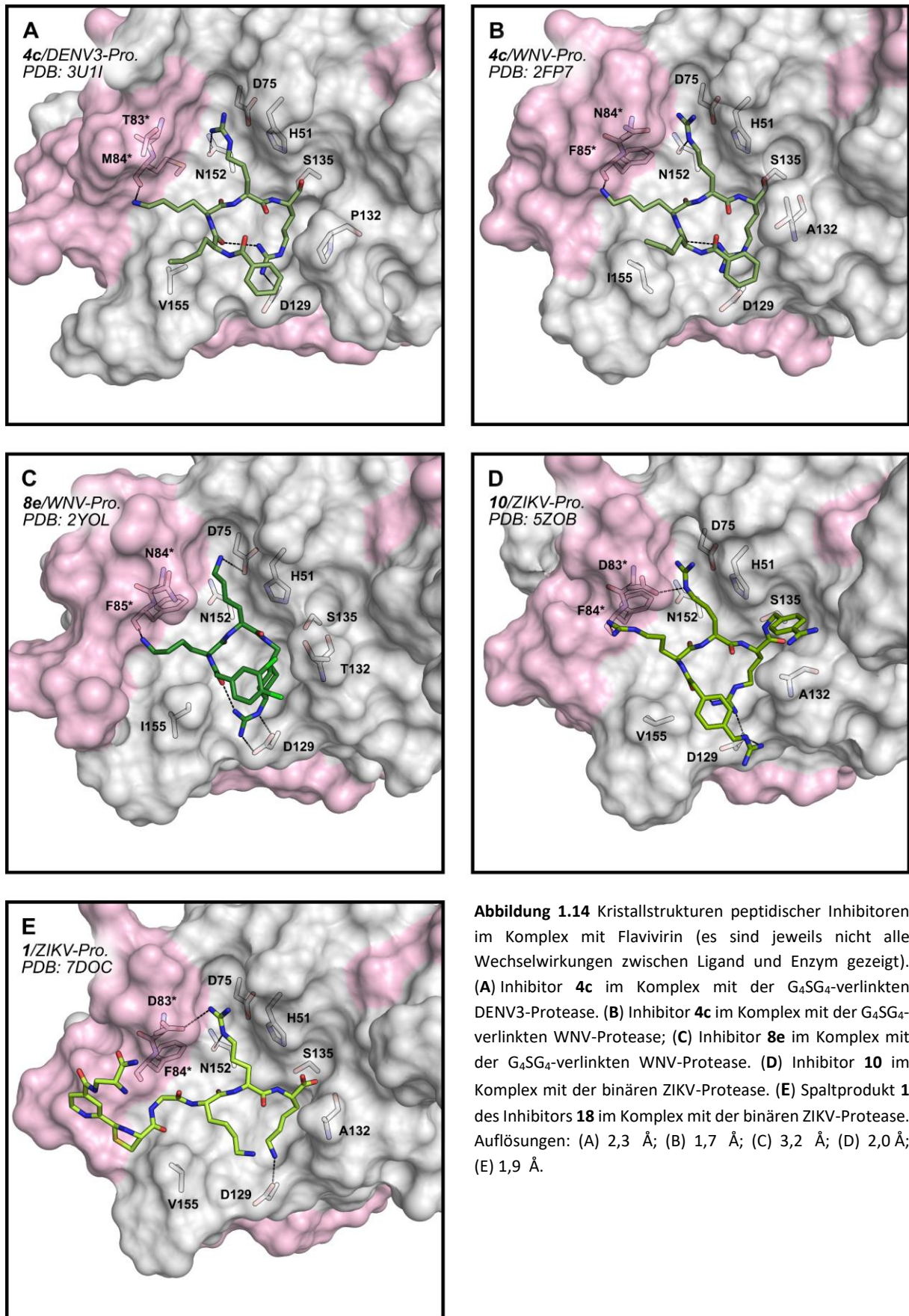


Abbildung 1.13 Peptid-Metall-Komplexe als Inhibitoren des Flavivirins. Die zugehörigen Hemmwerte sind Tabelle 1.2 (S.17) zu entnehmen.

Von einigen der in diesem Kapitel vorgestellten Inhibitoren sind Kristallstrukturen im Komplex mit Flavivirin bekannt. In Abbildung 1.14 sind die Kristallstrukturen des Arginal-Derivats **4c** (Bz–Nle–Lys–Arg–Arg–H) einmal im Komplex mit der DENV3-Protease und einmal im Komplex mit der WNV-Protease, des Inhibitors **8e** im Komplex mit der WNV-Protease sowie des Inhibitors **10** und des Liganden **1**, der das enzymatische Spaltprodukt des cyclischen Inhibitors **18** ist, jeweils im Komplex mit der ZIKV-Protease gezeigt.^{112,144,178-179} Die Inhibitoren **4c**, **8e** und **10** positionieren sich mit einer hufeisenförmigen Rückgratkonformation in das aktive Zentrum, wobei ihre P2- und P3-Seitenketten, und im Falle von **4c** auch die P4-Seitenkette, jeweils in die gleiche Richtung zeigen. Diese ungewöhnliche, nicht-kanonische Ausrichtung macht die Ausbildung einer ausgedehnten antiparallelen β -Faltblattstruktur zwischen Inhibitorrückgrat und den Resten aus der GLYGNG-Sequenz (NS3-Reste 148 bis 153) unmöglich, da die amidische NH-Gruppe des P3-Rests vom Enzym weg ins Lösungsmittel ragt. Wechselwirkungen mit G151 und G153 sind dennoch vorhanden (in Abb. 1.14 zur Wahrung der Übersichtlichkeit nicht dargestellt).

Der Ligand **1** ist kanonisch, also mit alternierend ausgerichteten Seitenketten, positioniert. Der hufeisenförmige Bindungsmodus unterscheidet sich vom kanonischen im Bereich der S1- und der S2-Tasche kaum. Die Ausrichtung des P3-Rests ist dagegen verschieden: Während die P3-Seitenkette im kanonischen Bindungsmodus nach unten ins Lösungsmittel ausgerichtet ist, zeigt sie im hufeisen-



förmigen Bindungsmodus in Richtung der 80*-Schleife und bildet eine Wasserstoffbrücke zum Carbonylsauerstoff des Rests 84* (WNV: F85*). Außer bei den hier gezeigten Komplexen findet sich die hufeisenförmige Ausrichtung bei drei weiteren Strukturen peptidischer Inhibitoren im Komplex mit Flavivirin (PDB: 3E90, 5ZMS, 5ZMQ).^{148,179-180} Alle Inhibitoren, die in den Komplexstrukturen hufeisenförmig ausgerichtet sind, besitzen eine P1-Seitenkette mit terminaler Guanidinogruppe und einen *N*-terminalen aromatischen Acylrest. Auf Basis dieser gemeinsamen Eigenschaften lässt sich der nicht-kanonische Bindungsmodus erklären: Dieser wird in allen oben beschriebenen Fällen durch eine intramolekulare Wasserstoffbrücke vom P1-Guanidin zum P4-Carbonylsauerstoff stabilisiert. Des Weiteren ermöglicht der aromatische Charakter der *N*-terminalen Acylgruppe eine Kation- π -Wechselwirkung mit dem P1-Guanidin und hydrophobe Wechselwirkungen mit den Resten 154 und 155 (i.d.R. V, I oder L). Über diese Wechselwirkungen wird die Konformation des Inhibitors stabilisiert. Die Unterscheidung zwischen hufeisenförmigem und kanonischem Bindungsmodus ist auf Dipeptide nicht anwendbar. Von Peptiden mit mehr als fünf Resten sind mit Ausnahme des Aprotinins (PDB: 2IJO)¹¹⁵ bisher keine Kristallstrukturen im Komplex mit Flavivirin bestimmt worden. Wegen des P3-Prolins und der Disulfidbrücke am P2-Cystein ist die Struktur des gebundenen Aprotinins nur bedingt mit den gebundenen Strukturen der oben beschriebenen Inhibitoren vergleichbar.

Es sei an dieser Stelle noch kurz auf die Unterschiede zwischen den aktiven Zentren der DENV-, der WNV- und der ZIKV-Protease eingegangen. Wie oben beschrieben, wird das D83* der ZIKV-Protease für dessen vergleichsweise hohe Aktivität verantwortlich gemacht; bei den Protasen der vier DENV-Serotypen befindet sich an der Position 83* entweder ein Threonin oder Serin, bei der WNV-Protease ein Asparagin (an der entsprechenden Position 84*). Ein weiterer Unterschied betrifft die Größe des aktiven Zentrums: Die Region, die durch die Seitenkette des P1-Rests und durch den *N*-terminalen Acylrest bei hufeisenförmigem Bindungsmodus bzw. durch die P3-Seitenkette bei kanonischem Bindungsmodus besetzt wird, wird durch die Reste 132 und 155 flankiert. An Position 132 besitzt die DENV-Protease ein Prolin, die WNV-Protease ein Threonin und die ZIKV-Protease ein Alanin; an Position 155 befindet sich bei der DENV- und der ZIKV-Protease ein Valin und bei der WNV-Protease ein Isoleucin. Daher ist diese Bindungsregion bei der WNV-Protease etwas enger als bei der DENV- und ZIKV-Protease. In den Strukturen der Inhibitoren **4c** und **8e** im Komplex mit der WNV-Protease (Abb. 1.14B und C) positioniert sich als Folge dieser Verengung der *N*-terminale Aromat näher am Rest 132 als in den Komplexstrukturen der DENV3- bzw. ZIKV-Protease (Abb. 1.14A und D).

1.2.2.2 Niedermolekulare kompetitive Inhibitoren

Die meisten der im vorigen Abschnitt vorgestellten peptidischen Inhibitoren können als Substratanaloga aufgefasst werden. Bei der Entwicklung niedermolekularer kompetitiver Flavivirininhibitoren ist zwar wegen der bekannten Substratspezifität und der bekannten Komplexkristallstrukturen peptidischer Inhibitoren ebenfalls ein rationales Wirkstoffdesign möglich, die Mehrzahl niedermolekularer Inhibitoren wurde jedoch in Hochdurchsatzscreenings (*high throughput screenings*, HTS), virtuellen Screenings und Docking-Experimenten oder durch Testung von Inhibitoren anderer Targets identifiziert. Da sich diese Arbeit mit peptidischen Inhibitoren beschäftigt, sei hier nur eine kleine Auswahl niedermolekularer Flavivirininhibitoren vorgestellt (Tab. 1.3; Abb. 1.15, S.30).

Tabelle 1.3 Niedermolekulare kompetitive Flavivirininhibitoren.

Nr.	Spezies	Proteasehemmung <i>in vitro</i> ^a	Hemmung der Virusvermehrung <i>in cellulo</i> ^a	Struktur	Referenz
22	ZIKV	IC ₅₀ = 14,2	EC ₅₀ = 42,6; <i>in vivo</i> wirksam	Novobiocin s. Abb. 1.15, S.30	181
23	ZIKV	IC ₅₀ = 2,6	EC ₅₀ = 0,4	Simeprevir s. Abb. 1.15, S.30	182
24	WNV	IC ₅₀ = 0,70	–	Tolcapon s. Abb. 1.15, S.30	183
	DENV1	IC ₅₀ = 1,15	–		
	DENV2	IC ₅₀ = 0,98	EC ₅₀ = 2,0; CC ₅₀ > 29,2		
	DENV3	IC ₅₀ = 0,91	–		
	DENV4	IC ₅₀ = 0,64	–		
25	ZIKV	IC ₅₀ = 0,52	EC ₅₀ = 1,25	s. Abb. 1.15, S.30	184
26	WNV	39,5 % (50 µM 26)	–	s. Abb. 1.15, S.30	185
	DENV2	40,6 % (50 µM 26)	–		
27	WNV	K _i = 44,6	–	s. Abb. 1.15, S.30	186
	DENV2	K _i = 35,7	–		
28	DENV2	IC ₅₀ = 2,24	–	s. Abb. 1.15, S.30	187
29	WNV	K _i = 3,4	EC ₅₀ = 1,4; CC ₅₀ = 104	s. Abb. 1.15, S.30	188
	DENV2	K _i = 30,2	–		
30	WNV	IC ₅₀ = 0,44	EC ₅₀ = 17,0	s. Abb. 1.15, S.30	189
31	ZIKV	IC ₅₀ = 1,5	–	s. Abb. 1.15, S.30	131,190-191
	WNV	IC ₅₀ = 0,105	–		
	DENV2	IC ₅₀ = 8,5	–		

^aAlle Werte in [µM], sofern nicht anders angegeben.

Bei den Verbindungen **22** bis **24** handelt es sich um zugelassene Wirkstoffe. Das Antibiotikum Novobiocin (**22**) und der HCV-Proteaseinhibitor Simeprevir (**23**) hemmen die ZIKV-Vermehrung *in cellulo*. Die Überlebensrate immunsupprimierter Mäuse war nach einer ZIKV-Infektion bei Behandlung mit Novobiocin signifikant höher als bei nicht behandelten Tieren. Beim Tolcapon (**24**), das in der Parkinson-Therapie eingesetzt wird, wurde *in cellulo* eine Hemmung der DENV2- und WNV-Vermehrung beobachtet.^{181-183,192} Mit rationalem Wirkstoffdesign wurden das Carbazolderivat **25**, das ein Mimetikum typischer Flavivirinsubstrate ist, sowie die Zimtsäurederivate **26** und **27**, die den Autoren nach reversibel kovalent an das Serin im aktiven Zentrum binden sollen, entwickelt.¹⁸⁴⁻¹⁸⁶ Ein

Beispiel für einen Inhibitor, der auf Basis eines HTS-Hits optimiert wurde, ist die Verbindung **28**.¹⁸⁷ Im Vergleich zur rational entwickelten Verbindung **27**, die mit einem Cyanoacrylamid das gleiche zentrale Pharmakophor besitzt, wurde für den Inhibitor **28** eine mehr als zehnfach stärkere Affinität zur DENV2-Protease festgestellt. Ein direkter HTS-Hit ist die Verbindung **29**, die ein in Zellkultur wirksamer Inhibitor der WNV-Protease ist.¹⁸⁸ Die Verbindung **30** wurde in einem virtuellen Screening identifiziert.¹⁸⁹ Der kompetitive Hemmmodus wurde für die Verbindungen **22-30** anhand ihrer Eigenschaften in enzymkinetischen Assays oder über Dockingexperimente ermittelt. Strukturell belegt werden konnte der kompetitive Hemmmodus für die Verbindung **31**. Diese reagiert in einer Umesterungsreaktion mit dem S135 des aktiven Zentrums, wodurch eben dieses S135 benzoyliert wird.^{131,190-191}

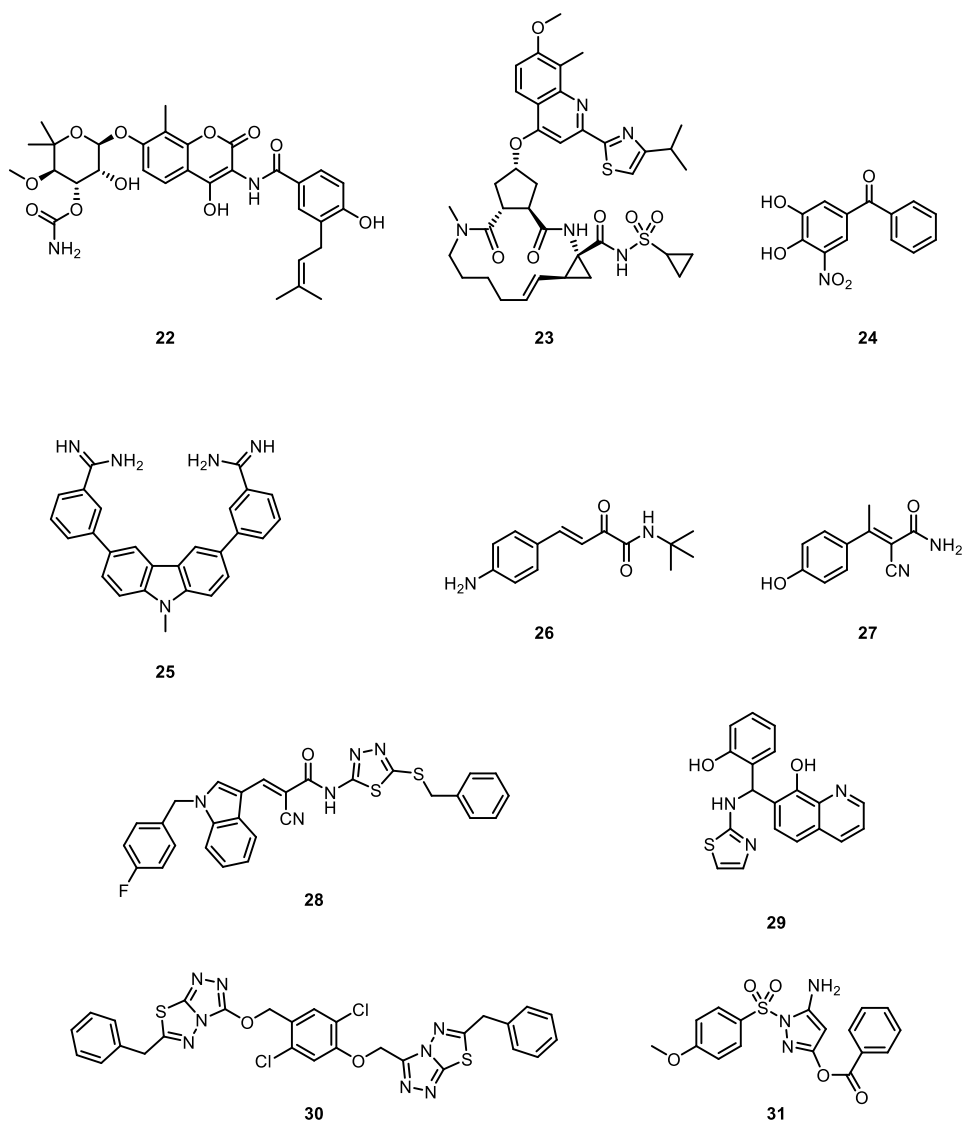


Abbildung 1.15 Niedermolekulare kompetitive Flavivirininhibitoren. Die zugehörigen Hemmwerte sind Tabelle 1.3 (S.29) zu entnehmen.

1.2.2.3 Allosterische Inhibitoren

Da sich diese Arbeit im Wesentlichen mit peptidischen Inhibitoren des aktiven Zentrums befasst, wird hier nur eine Auswahl allosterischer Inhibitoren vorgestellt. Da bisher noch keine Kristallstrukturen von Flavivirin im Komplex mit allosterischen Inhibitoren verfügbar sind, gibt es keine experimentellen Beweise bezüglich der exakten Bindungsstellen und es ist nicht hinreichend geklärt, ob die Inhibitoren an die offene, die geschlossene oder eine intermediäre Konformation des Enzyms binden (Abb. 1.16).

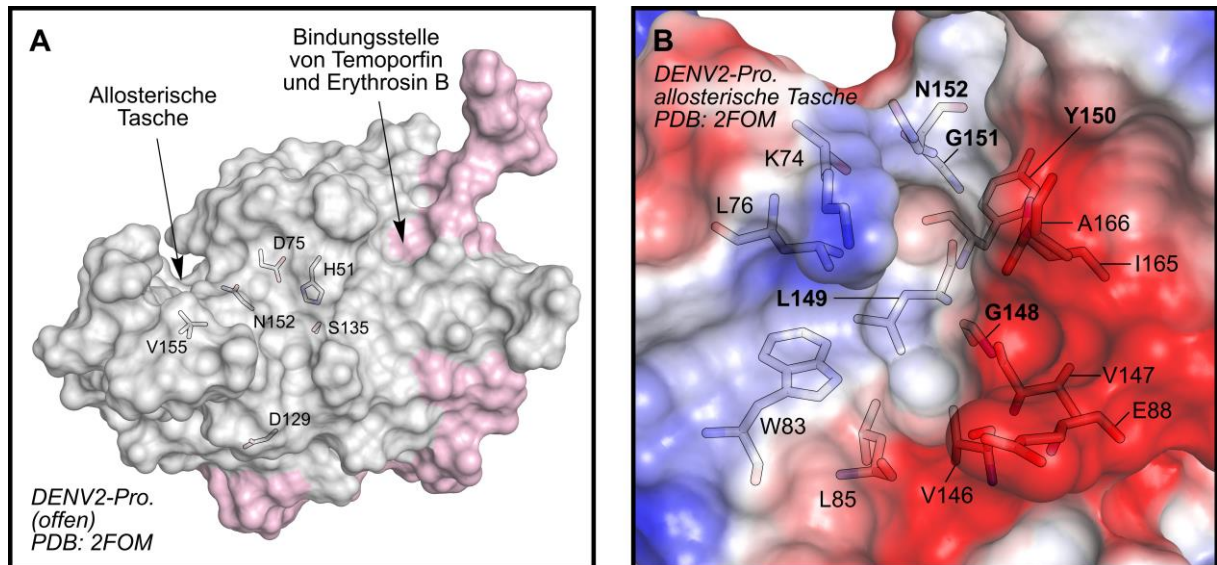


Abbildung 1.16 Postulierte allosterische Bindungsstellen des Flavivirins. Einige wichtige Reste des aktiven Zentrums bzw. der allosterischen Tasche sind als konturierte Stäbchenmodelle gezeigt. (A) Aktives Zentrum der DENV2-Protease in der offenen Konformation; die postulierte allosterische Tasche und die postulierte N-terminale Bindungsstelle sind durch Pfeile markiert. (B) Postulierte allosterische Tasche. Beschriftungen von Resten aus der GLYGNG-Sequenz sind fett gedruckt, die Oberfläche der Protease ist nach elektrostatischem Potential eingefärbt. Negatives Potential ist in Rot, positives in Blau gezeigt.

In mehreren Arbeiten wurde die Adressierung einer allosterischen Tasche beschrieben, die sich vom aktiven Zentrum aus gesehen hinter bzw. unter der konservierten GLYGNG-Sequenz (NS3-Reste 148 bis 153) auf der anderen Seite des Enzyms befindet. Außer von der GLYGNG-Sequenz, die den Boden der allosterischen Tasche bildet, wird diese von den Resten der 73-Schleife, den Resten 83-88 und den Resten 164-167 begrenzt.¹⁹³ Bei Besetzung dieser Tasche bindet ein Inhibitor unter anderem an die Reste der GLYGNG-Sequenz, wodurch eine Faltung in die geschlossene Konformation erschwert bzw. verhindert wird. Daher gehen inzwischen mehrere Gruppen davon aus, dass zumindest einige der allosterischen Inhibitoren an die offene Konformation des Flavivirins binden.¹⁹³⁻¹⁹⁴ Eine Sonderrolle wird der Seitenkette des N152 zugeschrieben, die mehreren Dockingergebnissen nach über eine Wasserstoffbrückenbindung an die allosterischen Inhibitoren dieser Bindungstasche gebunden ist und damit keine Wechselwirkung mehr mit dem P2-Rest eines Substratmoleküls eingehen kann. Beispiele für Inhibitoren, die mutmaßlich in die allosterische Tasche binden, sind die Benzothiazolderivate **32a**

und **32b** nach SCHIRMEISTER und die Verbindungen **33a** und **33b** nach SONG (Tab. 1.4, Abb. 1.17).¹⁹⁴⁻¹⁹⁸ Alle vier Verbindungen sind in Zellkultur gegen das Dengue-2- bzw. Zika-Virus wirksam. Interessant bezüglich ihrer Aktivität in Zellkultur ist die Verbindung **32b**. *In vitro* ist diese deutlich affiner zur ZIKV-Protease als zur DENV2-Protease, *in cellulo* dagegen konnte nur ein Effekt gegen die DENV2-Vermehrung, nicht aber gegen ZIKV-Vermehrung festgestellt werden. Die Autoren spekulierten, dass diese Beobachtung auf Unterschiede in der strukturellen intrazellulären Organisation zurückzuführen seien.⁸⁴ Die Verbindungen **34** bis **36** binden mutmaßlich an den 30-Loop der NS3-Kette und konkurrieren mit dem N-Terminus der NS2B-Kette um diese Bindungsstelle; ist diese Bindungsstelle von einer jener Verbindungen besetzt, wird entsprechend ein korrektes Anlagern von NS2B an NS3 und damit die Ausbildung der katalytisch wirksamen, geschlossen Konformation des Flavivirins verhindert.¹⁹⁹⁻²⁰¹

Tabelle 1.4 Allosterische Inhibitoren des Flavivirins.

Nr.	Spezies	Proteasehemmung <i>in vitro</i> ^a	Hemmung der Virusvermehrung <i>in cellulo</i> ^a	Struktur	Referenz
32a	DENV2	IC ₅₀ = 26	EC ₅₀ = 0,1	s. Abb. 1.17	195
32b	ZIKV	IC ₅₀ = 0,32	–	s. Abb. 1.17	194
	DENV2	IC ₅₀ = 10,0	Hemmung ^b		
33a	ZIKV	IC ₅₀ = 0,20	EC ₆₈ : 0,3 bis 0,6	s. Abb. 1.17	196-197
	WNV	IC ₅₀ = 0,78	–		
	DENV2	IC ₅₀ = 0,59	–		
	DENV3	IC ₅₀ = 0,52	–		
33b	ZIKV	IC ₅₀ = 0,32	EC ₆₈ = 1,0; CC ₅₀ > 10	s. Abb. 1.17	198
	WNV	IC ₅₀ = 5,7	–		
	DENV2	IC ₅₀ = 1,6	–		
34	DENV1	–	EC ₅₀ = 0,97; CC ₅₀ = 67,3	s. Abb. 1.17	199
	DENV2	–	EC ₅₀ = 0,98		
	DENV3	–	EC ₅₀ = 2,43		
	DENV4	–	EC ₅₀ = 0,74		
35	ZIKV	–	EC ₉₀ = 0,12; CC ₅₀ = 40,7 <i>in vivo</i> wirksam ^c	Temoporfin s. Abb. 1.17	200
	WNV	–	EC ₉₀ = 0,030		
	DENV2	IC ₅₀ = 1,1	EC ₉₀ = 0,11		
	YFV	–	EC ₉₀ = 0,015		
	JEV	–	EC ₉₀ = 0,025		
36	ZIKV	IC ₅₀ = 1,7	EC ₅₀ = 0,62; CC ₅₀ > 150	Erythrosin B s. Abb. 1.17	201
	WNV	–	EC ₅₀ = 0,66		
	DENV2	IC ₅₀ = 1,1	EC ₅₀ = 1,2; CC ₅₀ > 150		
	YFV	–	EC ₅₀ = 0,57		
	JEV	–	EC ₅₀ = 0,35		
37	ZIKV	IC ₅₀ = 0,62 ^d	–	s. Abb. 1.17	202
	WNV	IC ₅₀ = 3,9	–		

^aAlle Werte in [µM], sofern nicht anders angegeben; ^bein Zahlenwert wurde nicht angegeben; ^cwirksam *in vivo* gegen ZIKV (83 % Überlebensrate, 1 mg/kg täglich, 5 Tage); ^dIC₅₀ gegen die G₄SG₄-verlinkte ZIKV-Protease; ^eIC₅₀ gegen die binäre ZIKV-Protease.

Die Verbindung **34** wurde in einem virtuellen Screening identifiziert, Erythrosin B (**35**) ist ein zugelassener Lebensmittelfarbstoff und Temoporfin (**36**) ein durch die EMA zugelassener Photosensibilisator zur Behandlung von Plattenepithelkarzinomen. Temoporfin ist mit EC_{90} -Werten (!) im zweistelligen bis niedrigen dreistelligen nanomolaren Bereich gegen die Vermehrung des Zika-, des West-Nil, des Dengue-2-, des Japanische-Enzephalitis- und des Gelbfiebervirus der Flavivirininhibitor mit der stärksten Wirksamkeit in Zellkultur; in einem Mausmodell überlebten 83 % der Tiere eine tödliche Dosis an Zika-Viren bei einer fünftägigen Behandlung mit Temoporfin. Eine nicht-kompetitive Hemmung der ZIKV-Protease wurde in enzymkinetischen Assays für das makrocyclische Peptid **37** gefunden, wobei der genaue Hemmmechanismus unklar ist.²⁰²

Die strukturelle Diskussion beruht bis dato allein auf Docking-Ergebnissen und mechanistischen Überlegungen, da noch keine Kristallstruktur des Flavivirins im Komplex mit einem allosterischen Inhibitor bestimmt wurde. Die von SONG *et al.* veröffentlichte, vermeintliche Kristallstruktur eines allosterischen Inhibitors im Komplex mit der DENV2-Protease ist Gegenstand aktueller Diskussion und vermutlich nicht korrekt bestimmt.^{196,203-204}

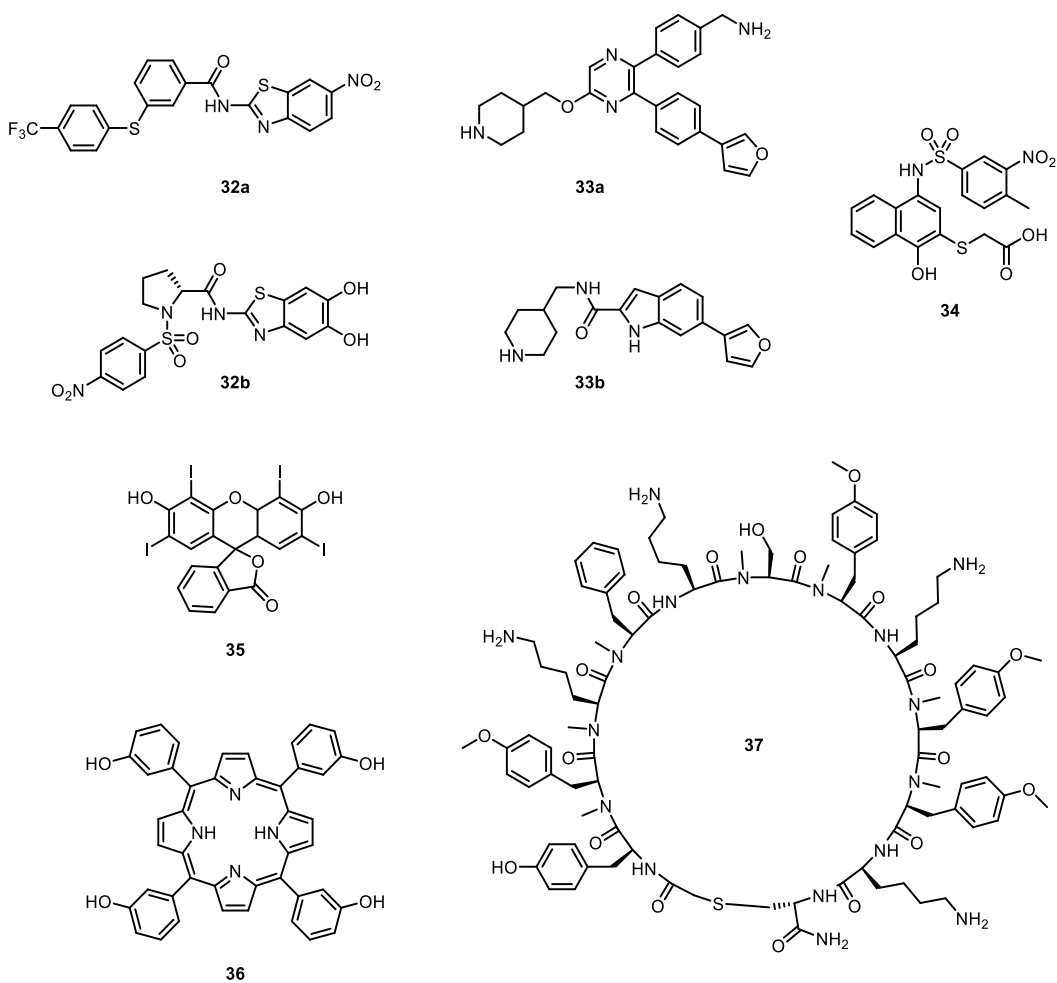


Abbildung 1.17 Eine Auswahl allosterischer Inhibitoren des Flavivirins. Die zugehörigen Hemmwerte sind Tabelle 1.4 zu entnehmen.

2 Ausgangsbedingungen und Zielsetzung

2.1 Hinweise zur Nomenklatur und zur Darstellung cyclischer Inhibitoren

In den folgenden Kapiteln werden hauptsächlich cyclische Inhibitoren vorgestellt, deren P3-Rest durch ein Segment aus Aminosäuren mit dem P1-Rest verknüpft ist. Das verknüpfende Segment wird als *Linker* oder *Linkersegment* bezeichnet. Derjenige Rest, der direkt mit dem C-Terminus des P1-Rests verknüpft ist, wird unabhängig von der Zahl der Linkerreste als *P ω -Rest* bezeichnet. Die übrigen Aminosäuren des Linkers werden abhängig von ihrer Position als P6-, P5- oder P4-Rest bezeichnet. Fällt der P ω -Rest mit dem P4-Rest zusammen, so wird vom *P ω -Rest* oder schlicht vom *Linker* gesprochen. Zur Hervorhebung einzelner Reste wird in der Darstellung chemischer Strukturen das in Abbildung 2.1 gezeigte Farbschema benutzt: Der P1-Rest ist in Schwarz gezeit, der P2-Rest in Blau, der P3-Rest in Orange, der P4-Rest in Grün und der P ω -Rest in Rot. Sind weitere Reste vorhanden, so ist der P5-Rest in Violett und der P6-Rest in Braun dargestellt. Häufig sind nur die für die Diskussion an der jeweiligen Textstelle relevanten Reste farbig hervorgehoben.

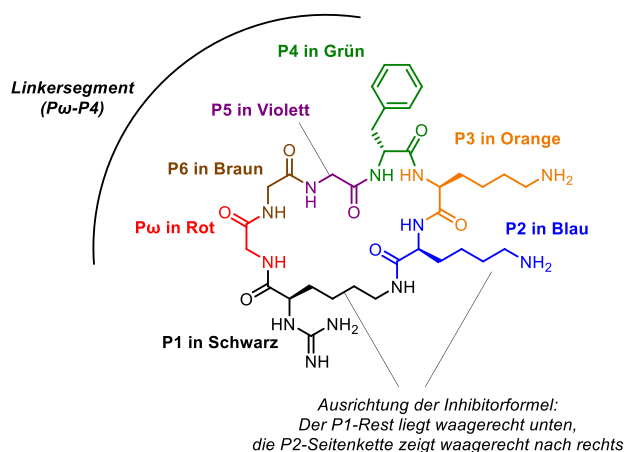


Abbildung 2.1 In dieser Arbeit benutzte Ausrichtung und Nomenklatur von Aminosäureresten mit zugehörigem Farbschema beispielhaft gezeigt am Inhibitor **C-25**.

Alle Inhibitoren, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden, werden wie folgt nummeriert: Der Nummer cyclischer Inhibitoren wird ein „C-“ vorangestellt, der Nummer von Inhibitoren mit C-terminaler Boronsäurefunktionalität ein „B-“ und der Nummer linearer Inhibitoren ohne Boronsäurefunktionalität ein „L-“. Entsprechend ergeben sich Nummern wie „C-25“, „B-8“ oder „L-1“.

Eine herausnehmbare Übersichtstabelle aller cyclischen Flavivirininhibitoren, die in den folgenden Kapiteln vorgestellt werden, befindet sich innen im hinteren Einband.

2.2 Ausgangsbedingungen

Die in diesem Kapitel vorgestellten Inhibitoren wurden bereits vor Beginn der vorliegenden Arbeit in der AG STEINMETZER hergestellt. Ihre Synthese war demzufolge *nicht* Teil der vorliegenden Arbeit. Die vollständige enzymkinetische Charakterisierung dieser Verbindungen war hingegen Teil dieser Arbeit: Sämtliche in diesem Abschnitt vorgestellten K_i -Werte wurden im Rahmen dieser Arbeit bestimmt, soweit nicht anders angegeben. Die in diesem Abschnitt gezeigten Komplexkristallstrukturen waren zu Beginn der Arbeit bekannt.

Die Inspiration zur Entwicklung erster makrocyclischer Inhibitoren lieferte die von M.Z. HAMMAMY (AG STEINMETZER) synthetisierte Verbindung **8e** (Abb. 2.2).¹⁴⁴ Die hufeisenförmige Konformation, die dieser Inhibitor im Komplex mit der WNV-Protease einnimmt, führt zu einem Abstand von ca. 4-5 Å zwischen dem Phenylring der P4-Acylgruppe und dem Cyclohexylring des P1-Rests. Diese Nähe des P4- und des P1-Rests zueinander wurde zur Entwicklung makrocyclischer Flavivirininhibitoren ausgenutzt.

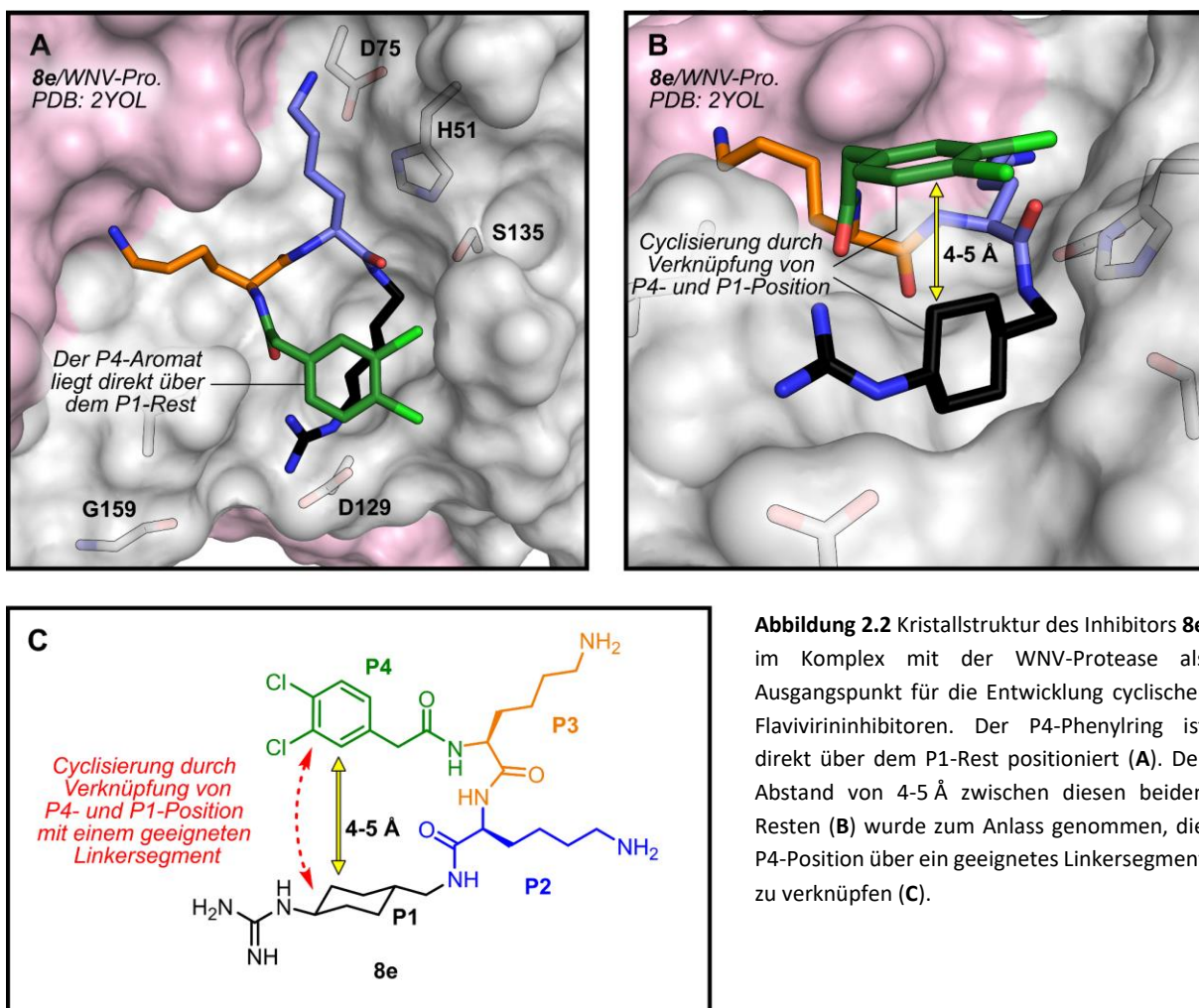


Abbildung 2.2 Kristallstruktur des Inhibitors **8e** im Komplex mit der WNV-Protease als Ausgangspunkt für die Entwicklung cyclischer Flavivirininhibitoren. Der P4-Phenylring ist direkt über dem P1-Rest positioniert (A). Der Abstand von 4-5 Å zwischen diesen beiden Resten (B) wurde zum Anlass genommen, die P4-Position über ein geeignetes Linkersegment zu verknüpfen (C).

Um eine Cyclisierung vom P4- zum P1-Rest möglich zu machen, wurde ein N_α -guanyliertes Lysin als P1-Rest ausgewählt. Dieses Lysin-Derivat wurde über seine Seitenkette mit dem C-Terminus des P2-Rests verknüpft. In P4-Position wurde 4-Aminomethylphenyllessigsäure (4-Amphac) eingebaut. Die Aminogruppe des 4-Amphac und die Carbonylgruppe des guanylierten P1-Lysins wurden schließlich durch eine Aminosäure verknüpft: Durch Einbau von γ -Aminobuttersäure (γ -Abu) als P ω -Rest wurde mit der Verbindung **38** durch J. WENZEL (geb. KOURETOVA; AG STEINMETZER) einer der ersten makrocyclischen, substratanalogen Flavivirininhibitoren hergestellt. Verglichen mit der linearen Verbindung **8e** hemmt der Inhibitor **38** zwar sowohl die ZIKV- als auch die WNV-Protease weniger effektiv, dennoch lieferte er den Beleg dafür, dass durch die Verknüpfung des P4-Rests mit dem P1-Rest grundsätzlich potente cyclische Inhibitoren hergestellt werden können. Ausgehend von **38** wurde nach der in Abbildung 2.3 gezeigten Optimierung der Inhibitor **42** erhalten, der als Basis und Leitstruktur für die meisten in dieser Arbeit entwickelten Verbindungen diente (**39** bis **42** wurden von D. ROGGE, AG STEINMETZER, synthetisiert). Die zugehörigen Kristallstrukturen im Komplex mit der ZIKV-Protease sind in Abbildung 2.4 (S.38) gezeigt.

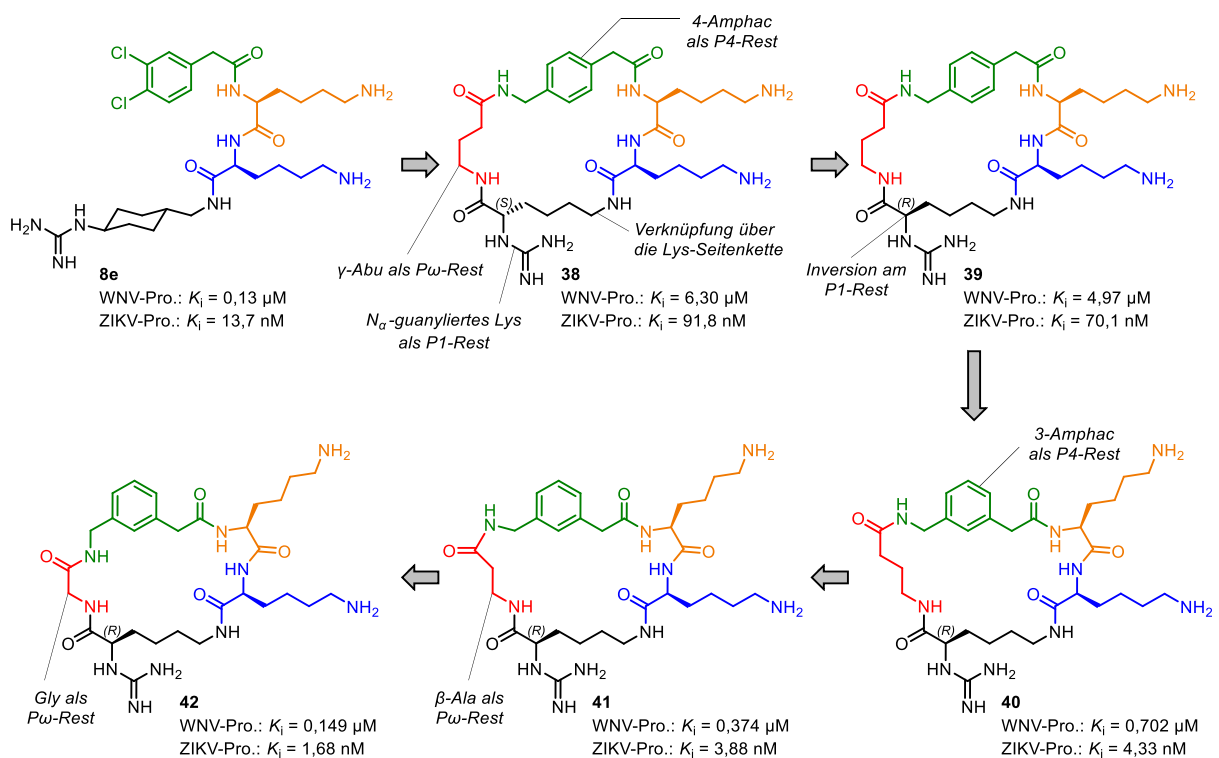


Abbildung 2.3 Optimierung substratanaloger, makrocyclischer Flavivirininhibitoren in der AG STEINMETZER.

Im Komplex mit der ZIKV-Protease zeigen die Inhibitoren **38** bis **42** (Abb. 2.4B-F) ähnliche Bindungsmodi wie die lineare Verbindung **8e** (Abb. 2.4A). Die Ausrichtung des Inhibitorrückgrats, der P3- und der P2-Seitenkette sowie deren Wechselwirkungen mit dem Enzym gleichen einander. In allen Komplexen sind die intramolekulare Wasserstoffbrücke zwischen dem P4-Carbonylsauerstoff und dem

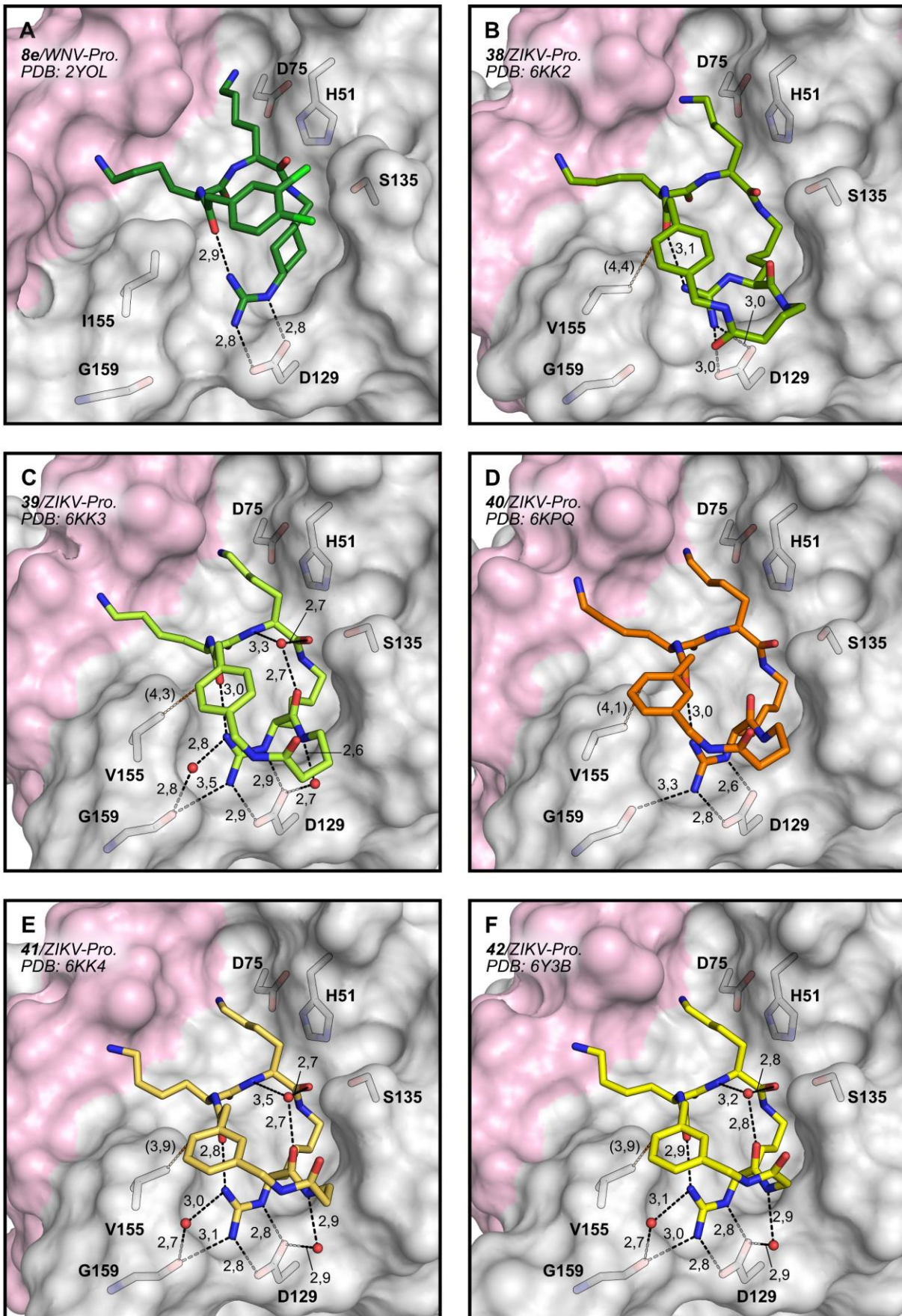


Abbildung 2.4 Beschreibung siehe S.39.

Abbildung 2.4 (S.38) Kristallstruktur der WNV-Protease im Komplex mit **8e** (A) sowie Kristallstrukturen der ZIKV-Protease im Komplex mit **38** (B), **39** (C), **40** (D), **41** (E) und **42** (F). Der Übersicht halber sind nur solche Wassermoleküle gezeigt, die eine Wechselwirkung zwischen dem Inhibitor und dem Enzym oder eine intramolekulare Wechselwirkung am Inhibitor vermitteln. Wechselwirkungen des Enzyms mit dem Inhibitorrückgrat, mit der P3-Seitenkette und mit der P2-Seitenkette ähneln einander in allen sechs Strukturen stark und sind nicht gezeigt. In Abbildung 2.5 (S.40) sind diese Wechselwirkung am Beispiel des wirksamsten Inhibitors (**42**) im Detail gezeigt. Auflösungen: (A) 3,2 Å; (B) 2,02 Å; (C) 2,05 Å; (D) 2,62 Å; (E) 1,74 Å; (F) 1,59 Å.

P1-Guanidin und die ladungsunterstützte Wasserstoffbrücke zwischen dem P1-Guanidin und D129 vorhanden. Der Vergleich der Komplexstrukturen der Inhibitoren **38** und **39** erklärt die leichte Präferenz für einen D-konfigurierten P1-Rest: Die Guanidinogruppe des L-konfigurierten P1-Rests des Inhibitors **38** bildet nur von einem Stickstoffatom ausgehend Wechselwirkungen mit D129 aus; beim D-Analogon **39** interagieren zwei Stickstoffe mit D129.

Am Beispiel der Verbindung **42** sei nun im Detail auf die Wechselwirkungen zwischen der Protease und dem Inhibitor eingegangen (Abb. 2.5, S.40): Grundsätzlich ähnelt der Bindungsmodus des Inhibitors **42** jenen der übrigen in den Abbildungen 2.4 und 1.14 (S.27) gezeigten Inhibitoren: Die P1-Guanidino-Gruppe interagiert mit D129 am Boden der S1-Tasche, die Seitenketten des P2- und P3-Rests sind parallel in Richtung der 80*-Schleife der NS2B-Kette ausgerichtet und der Phenylring des P4-Rests liegt über dem P1-Guanidin und V155. Das Rückgrat des P4-P1-Segments nimmt im Komplex mit der ZIKV-Protease eine Konformation ein, die der hufeisenförmigen Konformation linearer Inhibitoren gleicht (z.B. des Inhibitors **8e**, Abb. 2.4A). Für eine Stabilisierung dieser Konformation sorgen die kovalente Verknüpfung des P4-Rests mit dem P1-Rest über das P ω -Glycin und außerdem die intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem P4-Carbonylsauerstoff und dem P1-Guanidin sowie die Kation- π -Wechselwirkung zwischen dem P1-Guanidin und dem darüber positionierten P4-Aromaten. Des Weiteren bildet die P1-Guanidinogruppe eine doppelte Salzbrücke zur Carboxylgruppe des D129 und eine polare Wechselwirkung zum Carbonylsauerstoff des G159 sowie eine zweite, wasservermittelte Wechselwirkung zum G159 aus. Weitere wasservermittelte Wechselwirkungen bestehen zwischen der Seitenkette des D129 und den Amid-Gruppen des P ω - und des P4-Rests (Abb. 2.5B-C). Die Seitenkette des P2-Rests liegt in der S2-Bindetasche zwischen katalytischer Triade und 80*-Schleife und interagiert über Wasserstoffbrücken mit der Seitenkette des N152, dem Carbonylsauerstoff des G82* und der Seitenkette des D83*. Bei der Interaktion mit letzterer liegt eine Salzbrücke vor (Abb. 2.5D). Die Seitenkette des P3-Rests kann ebenfalls eine Salzbrücke zur Carboxylgruppe des D83* ausbilden, da D83* in dieser Kristallstruktur in zwei Konformationen vorliegt (Besetzung der P2-Tasche zu 53 % und der P3-Tasche zu 47 %). Weitere polare Wechselwirkungen des P3-Amins liegen mit dem Carbonylsauerstoff von F84* und der Hydroxygruppe von S85* vor. Die Seitenkette des S85* liegt in zwei Konformationen vor, wobei die zum P3-Amin hin orientierte Konformation zu 37 % besetzt ist (Abb. 2.5E).

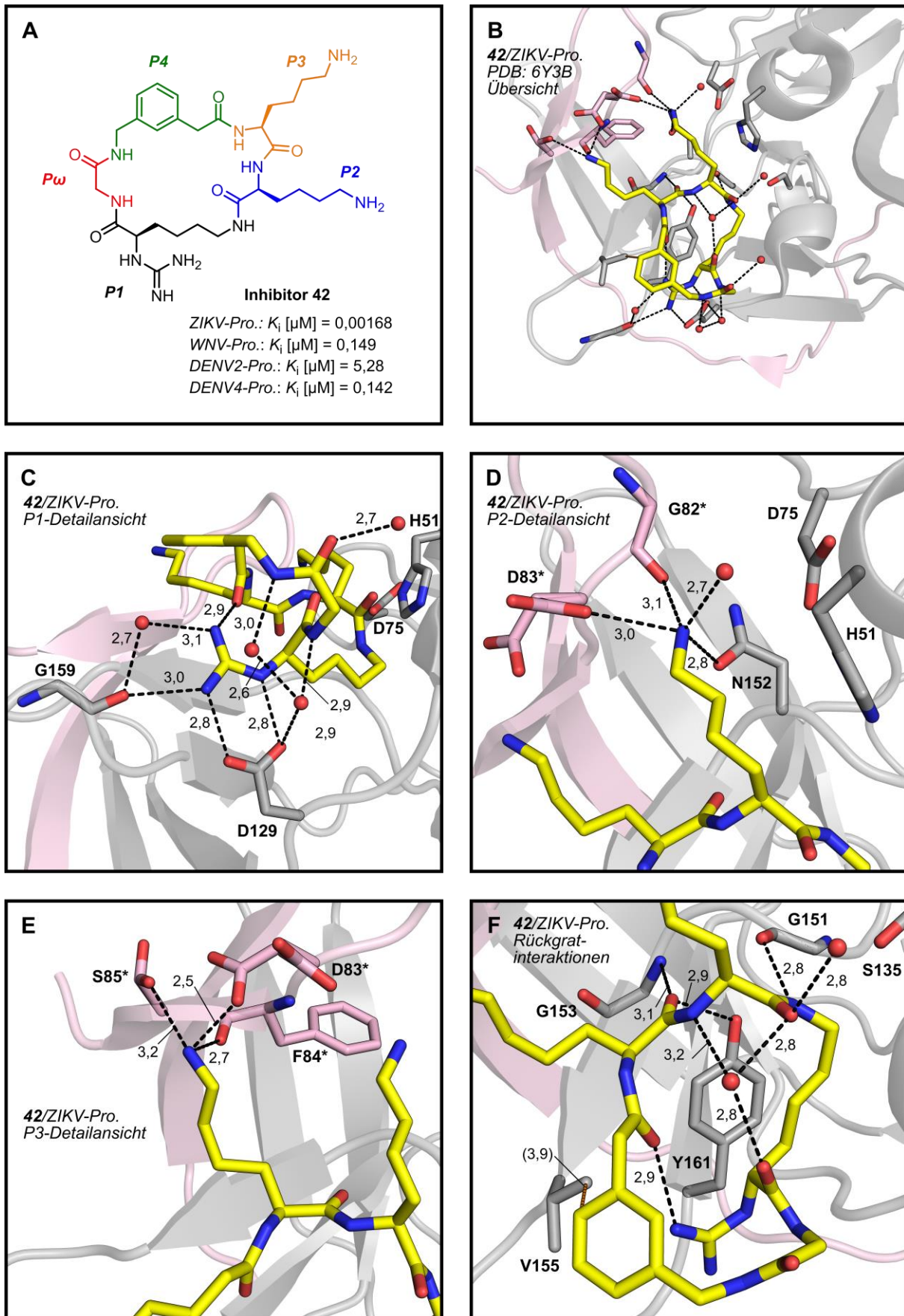


Abbildung 2.5 Beschreibung siehe S.41.

Abbildung 2.5 (S.40) Inhibitor **42** im Komplex mit der ZIKV-Protease. (A) Chemische Struktur des Inhibitors **42** mit Hemmkonstanten. (B) Übersichtsdarstellung des Komplexes aus **42** und der ZIKV-Protease mit allen Wechselwirkungen. (C) Wechselwirkungen des P1- und des P ω -Rests. (D) Wechselwirkungen des P2-Rests. (E) Wechselwirkungen des P3-Rests. (F) Wechselwirkungen des Inhibitorrückgrats. Auflösung: 1,59 Å.

Die Wechselwirkungen im Bereich des P3- und P2-Rückgrats zu G151, G153 und Y161 entsprechen den schon zuvor bei anderen Inhibitoren beobachteten. Der Abstand vom P4-Phenylring zur V155-Seitenkette (kürzester Abstand 3,9 Å) liegt im Bereich für Van-der-Waals-Kontakte. Zusätzlich existieren wasservermittelte Kontakte zwischen den Carbonylsauerstoffen des P1- und des P2-Rests und dem amidischen NH des P2-Rests, die auch in den Komplexstrukturen der Inhibitoren **39** und **41** vorhanden sind und die Inhibitor Konformation weiter stabilisieren (Abb. 2.5F).

2.3 Zielsetzung

Als erste Teilaufgabe der vorliegenden Arbeit sollte die vollständige enzymkinetische Charakterisierung der ersten Serie cyclischer Inhibitoren erfolgen: Dazu sollten die Hemmwirkungen der in der AG STEINMETZER hergestellten Inhibitoren auf die ZIKV- und die WNV-Protease untersucht und die zugehörigen Hemmkonstanten bestimmt werden. Auf Basis dieser Hemmkonstanten und der in Abbildung 2.4 (S.38) gezeigten Komplexkristallstrukturen sollten im nächsten Schritt Derivate des Inhibitors **42** hergestellt werden. Die Verbindung **42** ist *in vitro* ein sehr affiner Inhibitor des Flavivirins. In Zellkultur-Experimenten der AG BARTENSCHLAGER (Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg) konnte jedoch keine Wirkung gegen ZIKV festgestellt werden. Wegen des peptidischen Charakters und der drei positiv geladenen Gruppen (bei physiologischem pH-Wert) in P3-, P2- und P1-Position ist die schwache antivirale Wirksamkeit in Zellkultur höchstwahrscheinlich eine Folge einer niedrigen Zellpermeabilität dieses Inhibitorstyps.^{141,156,164} Daher sollte das primäre Ziel bei der Herstellung von Derivaten des Inhibitors **42** sein, Modifizierungsmöglichkeiten auszumachen. Diese Modifizierungsmöglichkeiten sollten anschließend zur Optimierung der Zellgängigkeit ausgenutzt werden.

Bei allen Derivaten sollte die Grundstruktur des Inhibitors **42** erhalten bleiben: α -Aminosäuren als P3- und P2-Rest, das über seine Seitenkette verknüpfte D-Lysin als P1-Rest und die Verbindung des P3-Rests mit dem P1-Rest über einen Aminosäurelinker. Zunächst sollte pro Derivat nur eine einzelne Aminosäure bzw. eine einzelne funktionelle Gruppe verändert werden, um den Effekt jeder Veränderung auf die Hemmwirkung und auf den Bindungsmodus studieren zu können (Abb. 2.6, S.42). In der P ω - und der P4-Position sollte vor allem der Einbau hydrophober Reste und Substituenten untersucht werden. In der P ω -Position sollte dies durch den Einbau von Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten geschehen; in der P4-Position sollte zuerst untersucht werden, durch welche leicht modifizierbaren Reste das 3-Amphac ersetzt werden könne, um anschließend ebenfalls möglichst hydrophobe Gruppen einzubauen. In P3- und P2-Position sollte vor allem der basische Charakter

reduziert werden; dazu sollten verschiedene α -Aminosäuren als Lysin-Mimetika getestet werden. Das über seine Seitenkette verknüpfte D-Lysin in P1-Position sollte als zentrales Strukturelement erhalten bleiben; es sollte lediglich untersucht werden, welche funktionellen Gruppen als Ersatz für das P1-Guanidin in Frage kommen. Die als zielführend ausgemachten Einzelmodifikationen sollten schließlich kombiniert werden, um so Inhibitoren mit einer möglichst geringen Zahl basischer Gruppen und einer möglichst hohen Lipophilie zu erhalten. Einer zweiten Strategie folgend, sollte die Leitstruktur **42** zu einem zellpenetrierenden Peptid hin modifiziert werden. Eine solche Strategie wurde von YOSHIDA *et al.* erfolgreich bei der Entwicklung des DENV2-Proteaseinhibitors **19b** eingesetzt (vgl. Kapitel 1.2.2.1, S.25).¹⁶⁵ Dafür sollte geprüft werden, in welche Positionen Arginin eingebaut werden könne und inwieweit Arginin-Sequenzen die Hemmwirkung beeinflussen.

Die Struktur-Wirkungs-Beziehung aller synthetisierten Derivate sollte in enzymkinetischen Messungen mit der ZIKV- und der WNV-Protease untersucht werden. Eine Auswahl an Derivaten sollte außerdem durch die AG LUO (Nanyang Technical University, Singapur) mit der DENV4-Protease getestet werden.

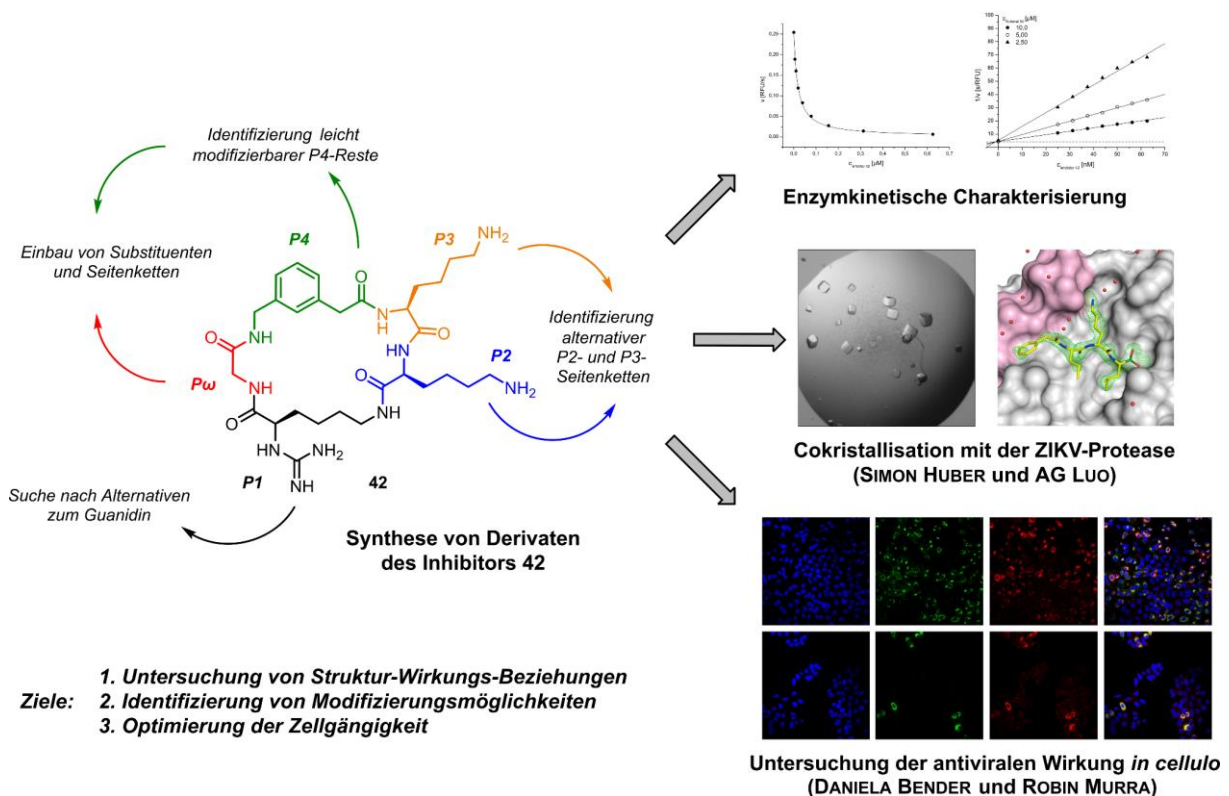


Abbildung 2.6 Ziel dieser Arbeit: Synthese und enzymkinetische Charakterisierung von Derivaten des Inhibitors **42**. Durch Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR, *structure activity relationship*) sollten Modifizierungsmöglichkeiten des Inhibitors **42** ausgemacht werden. Darauf aufbauend sollte eine Optimierung der Hemmstoffe erfolgen, um Inhibitoren mit antiviraler Wirksamkeit *in cellulo* zu erhalten.

Ebenfalls von einer Auswahl an Verbindungen sollten durch S. HUBER (AG STEINMETZER) bzw. durch die AG LUO Kristallstrukturen im Komplex mit der ZIKV-Protease bestimmt werden. Die aus den enzymkinetischen Messungen und den Komplexkristallstrukturen gewonnenen Erkenntnisse sollten wiederum in die Entwicklung und Optimierung neuer Inhibitoren einfließen. Für einige Verbindungen sollte außerdem durch D. BENDER und R.O. MURRA (AG HILDT, Paul-Ehrlich-Institut, Langen) die Hemmwirkung auf die ZIKV-Vermehrung in Zellkultur untersucht werden.

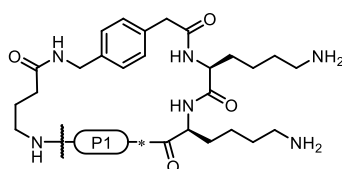
3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Identifizierung und Charakterisierung der Leitstruktur

3.1.1 Charakterisierung vorhandener Verbindungen und erster neuer Inhibitoren

Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, wurden die ersten cyclischen Flavivirininhibitoren des in dieser Arbeit behandelten Verbindungstyps (**38** und **39**) mit γ -Aminobuttersäure als P ω -Rest und 4-Amphac als P4-Rest entwickelt. Eine vollständige Übersicht über die K_i -Werte gegen die ZIKV-, WNV- und DENV4-Protease der Inhibitoren **38** und **39** und einiger analoger Verbindungen gibt Tabelle 3.1.

Tabelle 3.1 Cyclische Inhibitoren des Flavivirins mit 4-Amphac in P4-Position. Die Messungen mit der DENV4-Protease wurden von Mitarbeitern der AG Luo durchgeführt.



Nr.	n ^a	P1	K _i [μM]		
			ZIKV-Protease	WNV-Protease	DENV4-Protease
38	26		0,0918 ± 0,006	6,30 ± 0,49	11,0 ± 1,0
39	26		0,0701 ± 0,0092	4,97 ± 0,50	4,73 ± 0,50
43	25		0,846 ± 0,111	27,8 ± 4,4	117 ± 5
44	25		3,61 ± 1,33	22,0 ± 4,0	60,5 ± 5,7
45	26		24,7 ± 7,2	68,1 ± 5,0	94,5 ± 11,6
46	25		13,2 ± 1,7	31,7 ± 3,6	30,6 ± 3,9

^an: Anzahl der Atome im Makrocyclus.

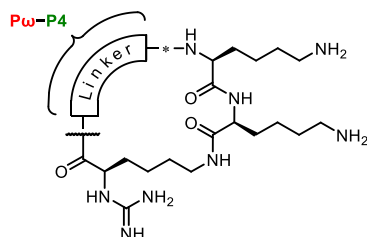
Aus dieser Serie sind einige Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu entnehmen: Erstens zeigt sich im Vergleich der Inhibitoren **38** und **39** mit den je um eine Methylengruppe verkürzten Homologen **43** und **44** eine Präferenz des Flavivirins für Lysinderivate als P1-Rest. Zweitens wird im Vergleich zwischen dem Inhibitor **38** mit L-konfiguriertem und **39** mit D-konfiguriertem P1-Lysin eine leichte Präferenz für die D-Konfiguration ersichtlich. Dagegen besitzt der von L-Ornithin abgeleitete

Inhibitor **43** eine etwas höhere Affinität zu allen drei Proteasen als sein D-Analogon **44**. Drittens führt der Austausch der P1-Guanidinogruppe gegen eine Aminofunktion, wie bei den Verbindungen **45** und **46**, zu einem drastischen Affinitätsverlust. Viertens gelten die drei zuvor beschriebenen Tendenzen für alle drei Proteasen, wenn auch mit unterschiedlich starker Ausprägung. Besonders deutlich ist der Affinitätsunterschied zwischen den guanylierten Verbindungen (**39**, **44**) und ihren Amin-Analoga (**45**, **46**) mit einem Faktor > 100 bei der ZIKV-Protease, während der Unterschied bei der WNV- und der DENV4-Protease geringer ausfällt. Allerdings liegen die Hemmkonstanten gegen die WNV- und DENV4-Protease im mikromolaren Bereich, wohingegen die ZIKV-Protease durch die potentesten Verbindungen **38** und **39** im zweistellig nanomolaren Bereich gehemmt wird. Die wesentliche Erkenntnis aus dieser Serie ist, dass durch eine Verknüpfung des ursprünglichen P4-Acyrests mit dem P1-Rest wirksame Inhibitoren erhalten werden können. Dabei wurde mit dem guanylierten D-Lysin-Derivat als P1-Baustein (Inhibitor **39**) die höchste Affinität zum Flavivirin erzielt.

Durch Einbau von 3-Aminomethylphenyllessigsäure (3-Amphac) anstelle von 4-Amphac als P4-Rest und die Verkürzung des P ω -Rests von γ -Aminobuttersäure über β -Alanin zu Glycin wurde die Hemmwirkung der cyclischen Inhibitoren deutlich erhöht (Verbindungen **40-42**; vgl. Abb. 2.4, S.38). In Tabelle 3.2 sind die K_i -Werte der Verbindungen **40-42** sowie einiger Analoga zusammengefasst. Wie bei den Inhibitoren mit 4-Amphac als P4-Rest gelten die beobachteten Tendenzen gleichermaßen für alle drei Proteasen, wobei die ZIKV-Protease effektiver als die WNV- und die DENV4-Protease gehemmt wird. Aus dieser Serie ist die Verbindung **42** der wirksamste Inhibitor aller drei Proteasen. Die Hemmwirkung auf die DENV2-Protease wurde nur für den Inhibitor **42** bestimmt und ist mit einem K_i -Wert von etwa 5 μ M deutlich niedriger als auf die übrigen Proteasen.

Eine weitere Verkürzung des Linkersegments (Inhibitor **47**) führte zu einer reduzierten Hemmwirkung. Die Verbindungen **C-1**, **C-2** und **48**, die in P4-Position die um eine Methylengruppe verkürzte 3-Aminophenyllessigsäure (3-Aphac) enthalten, sind weniger effektive Flavivirininhibitoren als ihre 3-Amphac-Analoga **40-42**. Eine Änderung der Reihenfolge der Linkerreste führte ebenfalls zu einer stark verringerten Affinität (Inhibitoren **49** und **50**). Bemerkenswert ist, dass sowohl unter den Inhibitoren mit 3-Amphac in P4-Position als auch unter ihren 3-Aphac-Analoga jeweils der Macrocyclus mit 23 Ringatomen der effektivste Inhibitor ist (Inhibitoren **42** und **C-2**). Formal unterscheiden sich diese Derivate nur in der Position der Peptidbindung zwischen dem P4- und dem P ω -Rest. Dies gestattet die Vermutung, dass diese Positionierung einen Einfluss auf die Hemmwirkung hat. Diese Beobachtung ist insofern überraschend, als dass die Peptidbindung zwischen P ω - und P4-Rest in den Komplexstrukturen mit der ZIKV-Protease zum Lösungsmittel hin orientiert ist und weder intramolekulare Interaktionen noch Wechselwirkungen mit dem Enzym eingeht (vgl. Abb. 2.4, S.38; Abb. 2.5, S.40; von den 3-Aphac-Derivaten wurden keine Komplexkristallstrukturen bestimmt).

Tabelle 3.2 Hemmung des Flavivirins durch cyclische Inhibitoren mit 3-Amphac in P4-Position (**40** bis **42**) und durch einige Analoga. Die Messungen mit der DENV4-Protease wurden von Mitarbeitern der AG Luo durchgeführt. Die Inhibitoren **49** und **50** wurden von L.C. SCHMACKE synthetisiert und enzymkinetisch charakterisiert.



Nr.	n ^a	P ω	P4	K _i [μ M]		
				ZIKV-Protease	WNV-Protease	DENV4-Protease
40	25	γ -Abu	3-Amphac	0,00433 \pm 0,00035	0,702 \pm 0,083	0,286 \pm 0,009
41	24	β -Ala	3-Amphac	0,00388 \pm 0,00081	0,374 \pm 0,044	0,182 \pm 0,005
42^b	23	Gly	3-Amphac	0,00168 \pm 0,00036	0,149 \pm 0,050	0,142 \pm 0,010
47	20	3-Amphac	–	0,0373 \pm 0,0047	15,3 \pm 0,8 (14,5 ²⁰⁵)	1,28 \pm 0,05
C-1	24	γ -Abu	3-Aphac	0,106 \pm 0,029	16,5 \pm 4,6	5,80 \pm 0,36
C-2	23	β -Ala	3-Aphac	0,0802 \pm 0,0097	4,28 \pm 0,31	7,96 \pm 0,55
48	22	Gly	3-Aphac	1,42 \pm 0,27	47,6 \pm 2,5	60,6 \pm 5,3
49²⁰⁶	23	3-Amphac	Gly	0,0412 \pm 0,0096	1,76 \pm 0,31	n.b.
50²⁰⁶	24	3-Amphac	β -Ala	0,0814 \pm 0,0221	56,5 \pm 2,3	n.b.

^an: Anzahl der Atome im Makrocyclus; ^bDENV2-Pro.: K_i = 5,28 μ M \pm 1,09 μ M.

Die Verbindungen **38** bis **50**, **C-1** und **C-2** sind allesamt reversibel-kompetitive Inhibitoren der drei untersuchten Proteasen, was sich aus ihrem Verhalten in enzymkinetischen Assays und, bei den Verbindungen **38** bis **42**, aus den Komplexkristallstrukturen mit der ZIKV-Protease ergibt (vgl. Abb. 2.4, S.38). Auf das enzymkinetische Verhalten des wirksamsten Inhibitors (**42**) wird im folgenden Kapitel im Detail eingegangen.

Einige Inhibitoren (**38**, **39**, **41** und **42**) wurden durch die Gruppe LUO auf ihre Stabilität gegenüber proteolytischer Spaltung durch die ZIKV-Protease untersucht (Abb. 3.1, S.48).¹²² Dazu wurden die Inhibitoren jeweils vier Stunden bei 37 °C mit der ZIKV-Protease inkubiert (Konzentrationsverhältnis Inhibitor/Protease 10:1) und anschließend massenspektrometrisch untersucht. Der Vergleich mit Negativkontrollen ohne ZIKV-Protease zeigt, dass die untersuchten makrocyclischen Verbindungen nicht von der ZIKV-Protease gespalten werden. In früheren, analogen Studien der Gruppen STEINMETZER und LUO mit linearen peptidischen Inhibitoren war hingegen eine Spaltung beobachtet worden.¹⁴⁸

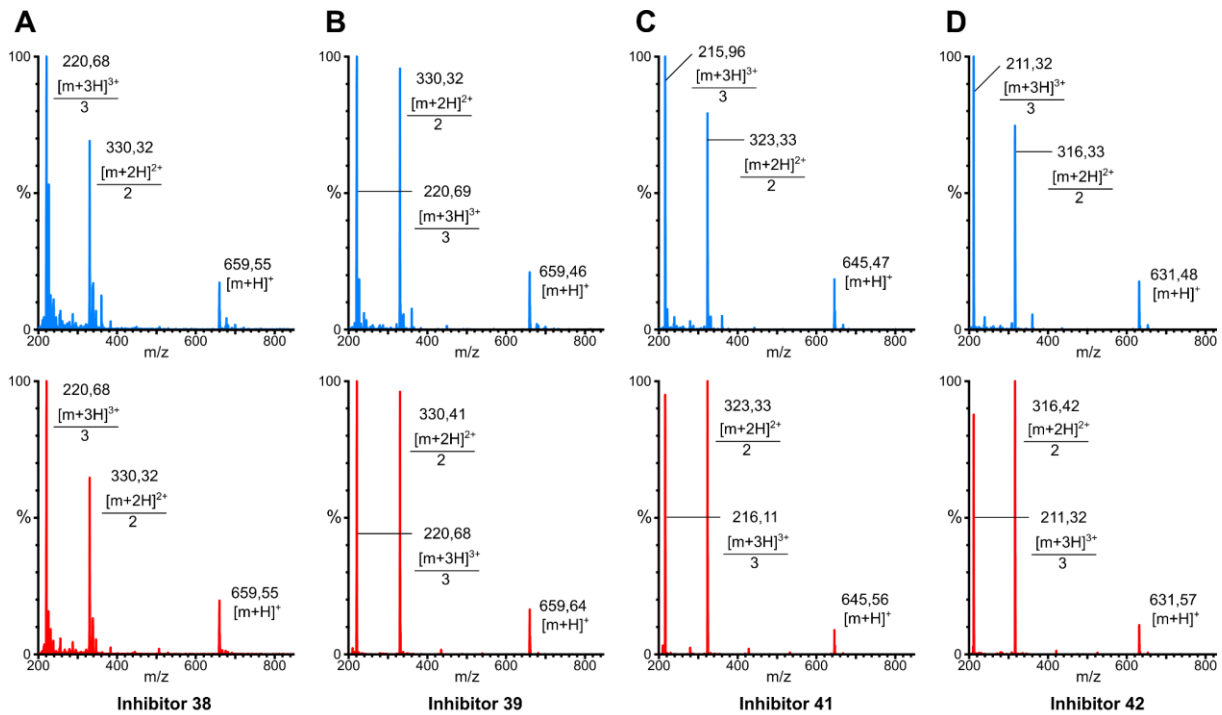


Abbildung 3.1 MS-Spektren einiger Inhibitoren nach Inkubation mit und ohne die ZIKV-Protease. Die Messungen wurden von Mitarbeitern der AG Luo (NTU, Singapur) durchgeführt. Oben mit blauen Signalen jeweils das Spektrum nach 4 h Inkubation mit der ZIKV-Protease, unten mit roten Signalen jeweils das Spektrum nach 4 h Inkubation ohne ZIKV-Protease.

3.1.2 Enzymkinetische Charakterisierung der Leitstruktur

In diesem Abschnitt soll genauer auf das Verhalten der Leitstruktur **42** in enzymkinetischen Assays eingegangen werden. Für enzymkinetische Messungen mit der ZIKV-Protease wurde in dieser Arbeit ein binäres Konstrukt nach LUO verwendet, das von S. HUBER hergestellt wurde.¹²¹⁻¹²² Die ZIKV-Protease zeichnet sich durch eine vergleichsweise hohe Aktivität aus.¹¹⁶ Dies gilt besonders für das nicht-kovalente, binäre Konstrukt, das einen höheren Substratumsatz als G₄SG₄-verlinkte oder autokatalytisch geschnittene Konstrukte zeigt.¹²⁴ Ein weiteres Charakteristikum der binären ZIKV-Protease ist ihre Anfälligkeit für eine Substratüberschusshemmung. Mit dem AMC-Substrat **51** (Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-AMC), das von vielen Gruppen für Messungen mit Flavivirin eingesetzt wird, tritt diese Substratüberschusshemmung schon bei Substratkonzentrationen < 10 μM auf.^{124,207} Für Messungen mit der ZIKV-Protease wurde in dieser Arbeit daher das Substrat **52** (Phac-Leu-Lys-Lys-Arg-AMC) eingesetzt, das ursprünglich für Messungen mit der WNV-Protease entwickelt worden war (Abb. 3.2).¹⁴⁴

Die Umsatzkurven der ZIKV-Protease bei verschiedenen Substratkonzentrationen sind in Abbildung 3.4A (S.51) gezeigt. Bei niedrigen Konzentrationen tritt nach einem initialen linearen Verlauf eine Krümmung der Umsatzkurven als Folge von Substratmangel auf. Ab ca. 20 μM tritt eine leichte Substratüberschusshemmung auf (Abb. 3.4B). Bei 10 μM tritt während einer Messdauer von

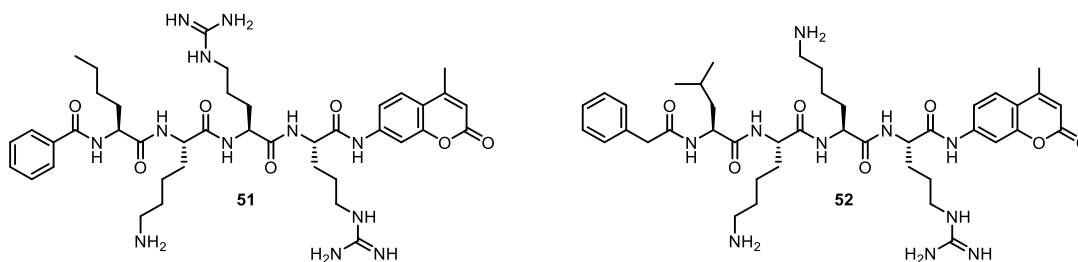


Abbildung 3.2 AMC-Substrate für enzymkinetische Messungen mit der ZIKV- und der WNV-Protease.

600 s weder eine Substratüberschusshemmung noch eine Krümmung bzw. ein Abflachen der Umsatzkurven auf, weshalb diese Substratkonzentration für die Bestimmung von Hemmkonstanten gewählt wurde. Werden nur die initialen, linearen Abschnitte der Umsatzkurven herangezogen, so ist auch ein Anpassen an die Michaelis-Menten-Gleichung (1) und somit die Bestimmung des K_M -Werts möglich (Abb. 3.4B). In Abbildung 3.4C-D sind die Dosis-Wirkungs-Kurven aus Messungen der Leitstruktur **42** mit der ZIKV-Protease gezeigt. In Abbildung 3.4C sind diese Messwerte an die Gleichung für reversibel kompetitive Hemmung (2) zur Bestimmung des K_i -Werts und in Abbildung 3.4D an die logistische Gleichung (3) zur Bestimmung des IC_{50} -Werts angepasst. Die Anpassungen lassen sich für die Leitstruktur und die übrigen in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Inhibitoren mit hohem Bestimmtheitsmaß durchführen. Dies bestätigt den kompetitiven Hemmmodus, den die Substratanalogie der Inhibitoren und die Komplexkristallstrukturen mit der ZIKV-Protease nahegelegt hatten. Im Mittel beträgt der Hill-Koeffizient p bei IC_{50} -Bestimmungen mit der Leitstruktur **42** unter den oben genannten Bedingungen 1,01, was einen Hemmmodus ohne Kooperativität anzeigt und die Berechnung des K_i -Werts mit Gleichung (2) rechtfertigt.

$$v_0 = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_M + [S]} \quad (1) \quad v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_M \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (2) \quad v = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^p} \quad (3)$$

K_i : Hemmkonstante; K_M : Michaelis-Menten-Konstante; $[I]$: InhibitorKonzentration; IC_{50} : Mittlere inhibitorische Konzentration; p : Hill-Koeffizient; $[S]$: Substratkonzentration; v_0 : Umsatzgeschwindigkeit der ungehemmten Reaktion; V_{\max} : Maximale Umsatzgeschwindigkeit; v : Von $[I]$ abhängige Geschwindigkeit der gehemmten Reaktion.

Der kompetitive Hemmmodus wurde außerdem durch einen Dixon-Plot²⁰⁸ mit drei verschiedenen Substratkonzentrationen bestätigt (Abb. 3.4E). Üblicherweise werden, so auch in dieser Arbeit, enzymkinetische Messungen mit Flavivirin bei pH 8,5 durchgeführt. Um das kinetische Verhalten des Flavivirins bei physiologischem pH einschätzen zu können, wurden die enzymkinetischen Parameter K_M , k_{cat} , k_{cat}/K_M und der K_i -Wert der Leitstruktur **42** zusätzlich bei pH 8,0, pH 7,5 und pH 7,0 bestimmt (Abb. 3.4F; Tab. 3.3, S.50). Bei pH 8,5 sind die Affinität zum Substrat, was sich im niedrigen K_M -Wert widerspiegelt, und die Wechselzahl k_{cat} am größten, wobei die k_{cat} -Werte bei pH 8,5 und pH 8,0 identisch sind. Bei Erniedrigung des pH-Wertes (8,5 \rightarrow 8,0 \rightarrow 7,5 \rightarrow 7,0) wird der K_M -Wert stufenweise deutlich größer, während der k_{cat} -Wert ab pH 7,5 abnimmt. Entsprechend ist das Verhältnis k_{cat}/K_M , das einer

Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung der Reaktion des freien Enzyms mit dem freien Substrat bis zum Erreichen des Übergangszustands entspricht und als Maß für die Eignung eines Substrats (*performance constant*) angesehen werden kann, bei pH 8,5 am größten. Ein ähnlicher Einfluss des pH-Werts auf die proteolytische Aktivität wurde von LEUNG für die DENV2-Protease beschrieben.¹¹⁷ Bei pH 4,5, der für Kristallisationsexperimente genutzt wird, verliert die Protease ihre Aktivität zur Gänze, weshalb eine sinnvolle Bestimmung der enzymkinetischen Parameter bei diesem pH-Wert nicht möglich ist. Mit sinkendem pH-Wert sinkt auch die Affinität des Inhibitors **42** zur ZIKV-Protease.

Tabelle 3.3 pH-Abhängigkeit der enzymkinetischen Parameter des Substrats **52** (Phac–Leu–Lys–Lys–Arg–AMC) und des K_i -Werts des Inhibitors **42** bei Messungen mit der ZIKV-Protease. Beim zur Kristallisation verwendeten pH von 4,5 ist keine Aktivität der ZIKV-Protease messbar.

pH	k_{cat} [s^{-1}]	K_M [μM]	k_{cat}/K_M [$M^{-1}s^{-1}$]	K_i [μM] des Inhibitors 42
8,5	$1,06 \pm 0,06$	$1,80 \pm 0,16$	$5,89 \times 10^5 \pm 0,17 \times 10^5$	$0,00168 \pm 0,00036$
8,0	$1,06 \pm 0,05$	$4,17 \pm 0,19$	$2,55 \times 10^5 \pm 0,08 \times 10^5$	$0,0107 \pm 0,0025$
7,5	$0,896 \pm 0,038$	$9,86 \pm 0,20$	$9,09 \times 10^4 \pm 0,20 \times 10^4$	$0,0258 \pm 0,0076$
7,0	$0,350 \pm 0,078$	$37,6 \pm 7,2$	$9,32 \times 10^3 \pm 0,30 \times 10^3$	$0,149 \pm 0,018$
4,5	–	–	–	–

Für Messungen mit der WNV-Protease wurde ein G_4SG_4 -verlinktes Konstrukt nach HILGENFELD, ebenfalls mit dem Substrat **52**, verwendet (Abb. 3.5, S.52).¹⁴⁴ Anders als mit der ZIKV-Protease sind mit der WNV-Protease sinnvolle Messungen in einem deutlich größeren Substratkonzentrationsbereich möglich; im untersuchten Bereich zwischen $6,25 \mu M$ und $200 \mu M$ wurden weder eine Substratüberschusshemmung noch eine Krümmung der Umsatzkurven durch Substratmangel beobachtet (Abb. 3.5A). Die Anpassungen an die Gleichungen (1), (2) und (3) zur Bestimmung von K_M , K_i und IC_{50} waren jeweils mit hohem Bestimmtheitsmaß möglich (Abb. 3.5B-D). Der kompetitive Hemmodus der Leitstruktur **42** wurde zusätzlich mit einem Dixon-Plot bestätigt (Abb. 3.5E).

Die Leitstruktur **42** wurde außerdem mit der G_4SG_4 -verlinkten DENV2-Protease nach SCHIRMEISTER charakterisiert; als Substrat wurde Phac–Lys–Arg–Arg–AMC¹⁹⁵ (**53**) eingesetzt (Abb. 3.3; Abb. 3.6, S.53). Die Hemmwirkung des Inhibitors **42** ist auf die DENV2-Protease deutlich niedriger als auf die ZIKV- und die WNV-Protease.

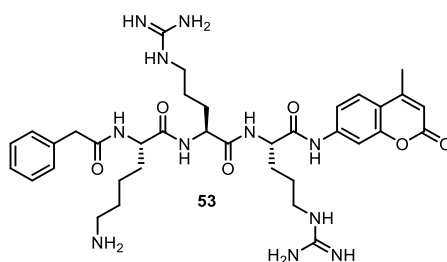


Abbildung 3.3 AMC-Substrat **53** für enzymkinetische Messungen mit der DENV2-Protease.

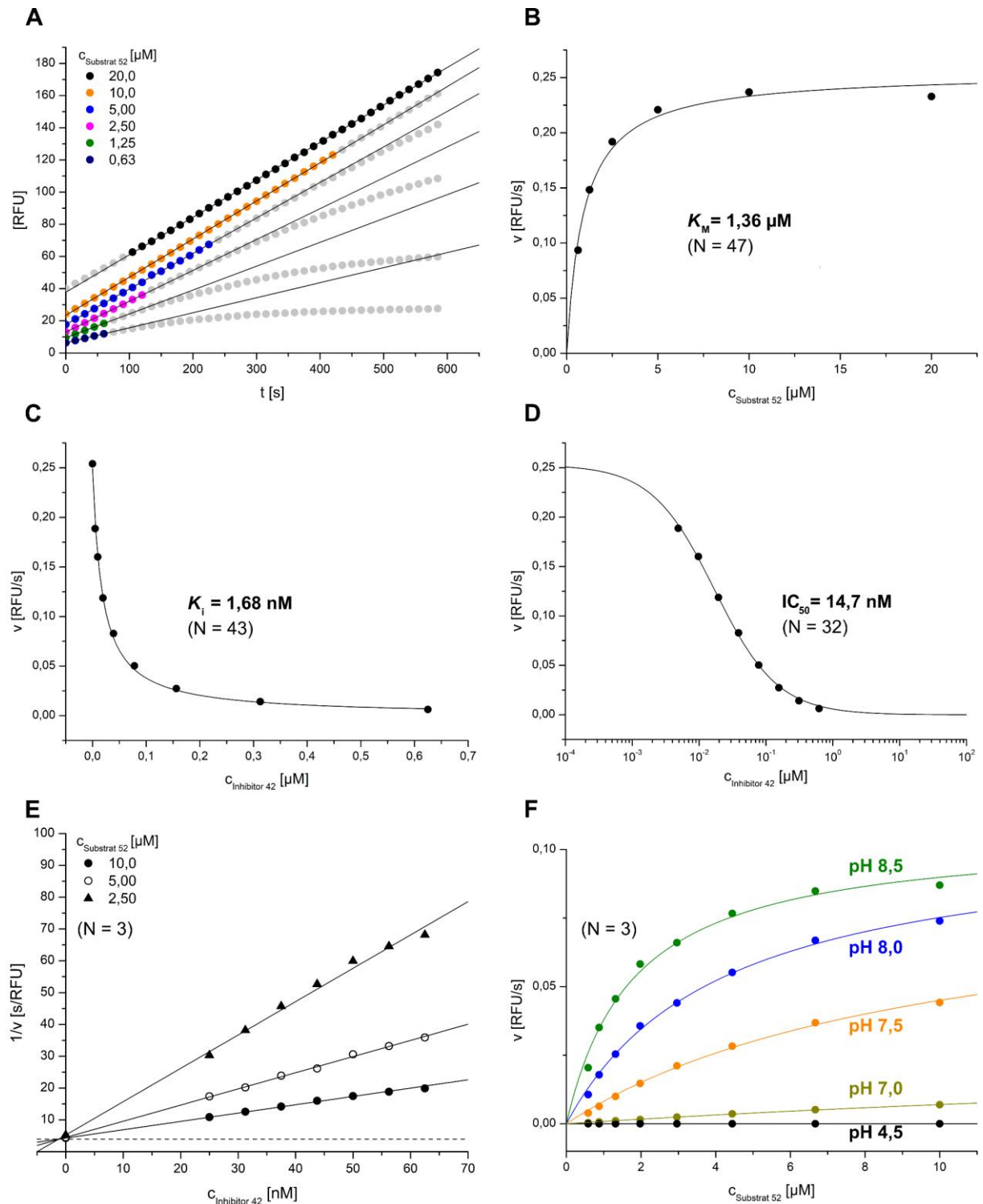


Abbildung 3.4 Enzymkinetische Charakterisierung der ZIKV-Protease und des Inhibitors **42**. Die genauen Messbedingungen sind Kapitel 5.2 (S.157 f.) zu entnehmen; N: Anzahl der Messungen. **(A)** Umsatzkurven des Substrats **52** (Phac-Leu-Lys-Lys-Arg-AMC). **(B)** Michaelis-Menten-Auftragung der Umsatzgeschwindigkeiten des Substrats **52** und Anpassung an die Michaelis-Menten-Gleichung (1). **(C)** Dosis-Wirkungs-Kurve des Inhibitors **42** und Anpassung an die Gleichung für kompetitive Hemmung (2) bei einer Substratkonzentration von $10 \mu\text{M}$. **(D)** Logarithmische Auftragung der Dosis-Wirkungs-Kurve bei einer Substratkonzentration von $10 \mu\text{M}$ und Anpassung an die logistische Gleichung (3). **(E)** Auftragung der Dosis-Wirkungs-Kurven nach DIXON bei drei verschiedenen Substratkonzentrationen; der $1/v$ -Wert der gestrichelten Linie entspricht $1/V_{\text{max}}$. **(F)** Michaelis-Menten-Auftragung nach der Messung mit dem Substrat **52** bei verschiedenen pH-Werten.

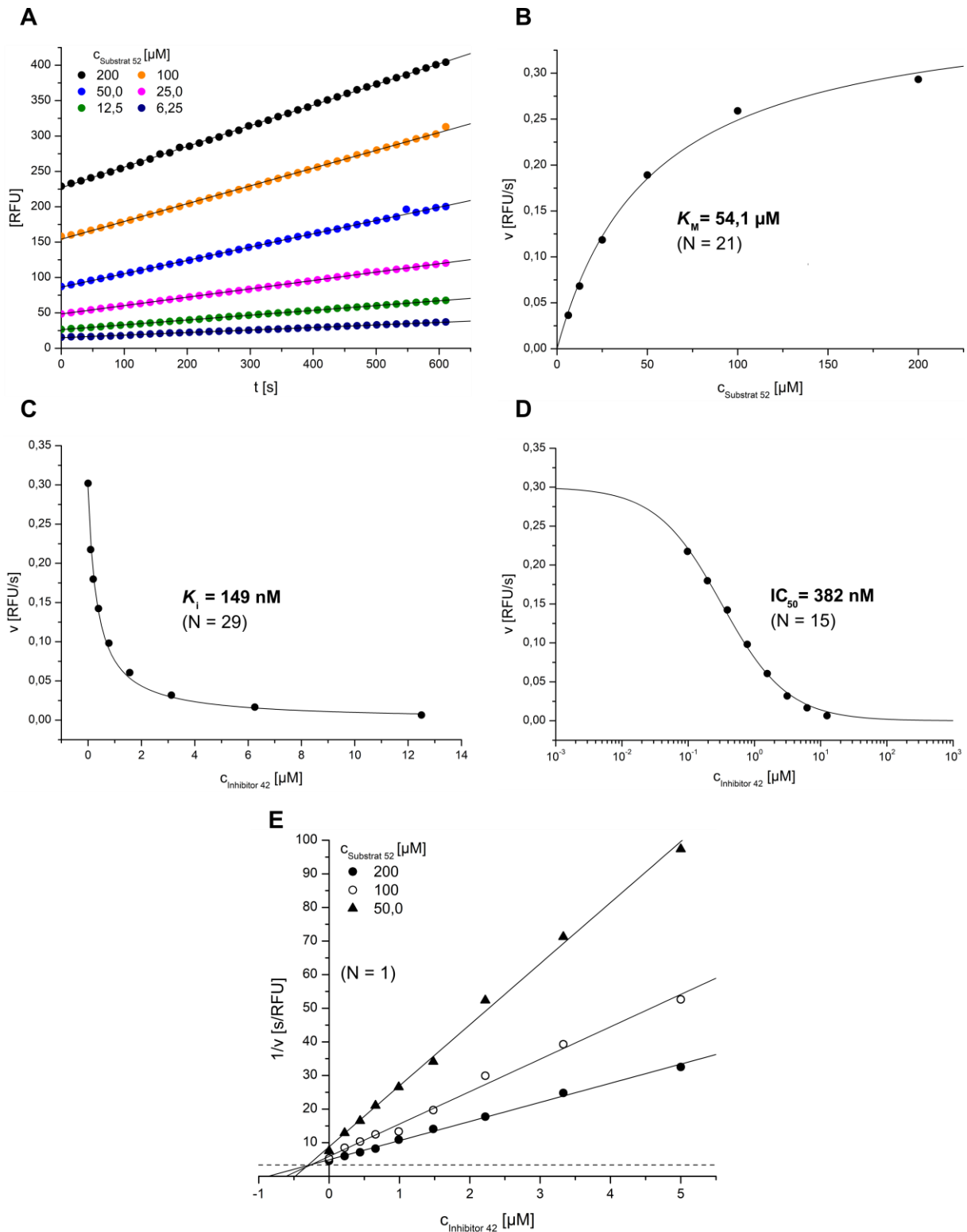


Abbildung 3.5 Enzymkinetische Charakterisierung der WNV-Protease und des Inhibitors **42**. Die genauen Messbedingungen sind Kapitel 5.2 (S.158) zu entnehmen; N: Anzahl der Messungen. **(A)** Umsatzkurven des Substrats **52** (Phac-Leu-Lys-Lys-Arg-AMC). **(B)** Auftragung der Umsatzgeschwindigkeiten des Substrats **52** und Anpassung an die Michaelis-Menten-Gleichung (1). **(C)** Dosis-Wirkungs-Kurve des Inhibitors **42** bei einer Substratkonzentration von 100 μM und Anpassung an die Gleichung für kompetitive Hemmung (2). **(D)** Logarithmische Auftragung der Dosis-Wirkungs-Kurve bei einer Substratkonzentration von 100 μM und Anpassung an die logistische Gleichung (3). **(E)** Auftragung der Dosis-Wirkungs-Kurven nach DIXON bei drei verschiedenen Substratkonzentrationen; der 1/v-Wert der gestrichelten Linie entspricht $1/v_{\text{max}}$.

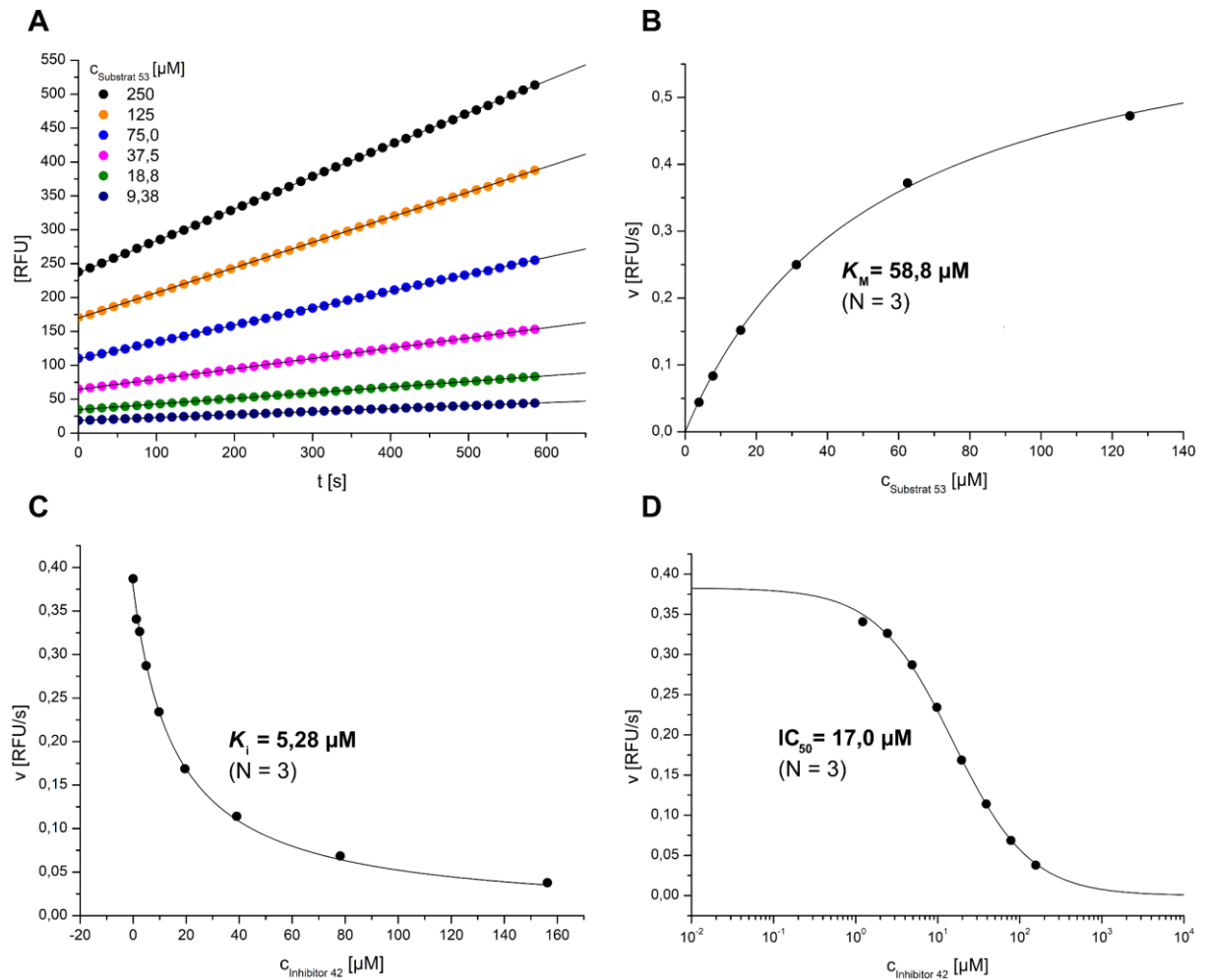
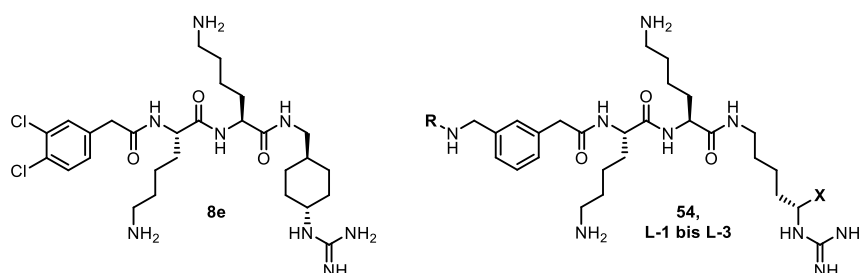


Abbildung 3.6 Enzymkinetische Charakterisierung der DENV2-Protease und des Inhibitors **42**. Die genauen Messbedingungen sind Kapitel 5.2 (S.159) zu entnehmen; N: Anzahl der Messungen. **(A)** Umsatzkurven des Substrats **53** (Phac-Lys-Arg-Arg-AMC). **(B)** Michaelis-Menten-Auftragung der Umsatzgeschwindigkeiten des Substrats **53** und Anpassung an die Michaelis-Menten-Gleichung (1). **(C)** Dosis-Wirkungs-Kurve des Inhibitors **42** bei einer Substratkonzentration von $125 \mu\text{M}$ und Anpassung an die Gleichung für kompetitive Hemmung (2). **(D)** Logarithmische Auftragung der Dosis-Wirkungs-Kurve bei einer Substratkonzentration von $125 \mu\text{M}$ und Anpassung an die logistische Gleichung (3).

3.1.3 Lineare Referenzverbindungen

Die cyclische Leitstruktur **42** hat eine höhere Affinität zur ZIKV-Protease als die lineare Ausgangsverbindung **8e**. Die Affinität beider Verbindungen zur WNV-Protease ist gleich, sofern der publizierte K_i -Wert (0,13 μ M) von **8e** herangezogen wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für **8e** unter den gleichen Messbedingungen wie bei den übrigen Inhibitoren ein K_i -Wert von 0,531 μ M bestimmt. Da sich die Verbindungen **8e** und **42** jedoch nicht nur in ihrem cyclischen bzw. linearen Charakter unterscheiden, sondern zusätzlich der P1- und der P4-Rest verschieden sind, lässt der Vergleich der beiden Verbindungen keine aussagekräftigen Schlüsse auf den Effekt der Cyclisierung zu. Um den Effekt der Cyclisierung zu studieren, wurden die vier linearen Referenzverbindungen **54** und **L-1** bis **L-3** synthetisiert und ihre jeweilige Affinität zur ZIKV-, WNV- und DENV4-Protease bestimmt (Tab. 3.4). Von den Verbindungen **54**, **L-2** und **L-3** wurden außerdem Kristallstrukturen im Komplex mit der ZIKV-Protease bestimmt (Abb. 3.7).

Tabelle 3.4 Lineare Analoga der Leitstruktur **42**. Die Verbindung **54** wurde von D. ROGGE (AG STEINMETZER) synthetisiert. Die Messungen mit der DENV4-Protease wurden von Mitarbeitern der AG LUO durchgeführt.



Nr.	R	X	K_i [μ M]		
			ZIKV-Protease	WNV-Protease	DENV4-Protease
8e	–	–	0,0137 \pm 0,0014	0,531 \pm 0,055 (0,13 ¹⁴⁴)	n.b.
54	H-Gly	CO ₂ H	2,04 \pm 0,60	51,6 \pm 0,7	75,0 \pm 3,4
L-1	H-Gly	CONH ₂	0,0136 \pm 0,0026	1,55 \pm 0,38	0,775 \pm 0,047
L-2	Ac	CONH ₂	0,00948 \pm 0,00061	1,48 \pm 0,10	1,21 \pm 0,09
L-3	Ac	H	0,0882 \pm 0,0038	4,94 \pm 0,53	18,1 \pm 1,2

Das P4-P2-Segment (3-Amphac–Lys–Lys) dieser linearen Inhibitoren entspricht dem der Leitstruktur **42**. Im Falle der Verbindung **54** mit einem *N*-terminalen Glycin und einem guanylierten, über die Seitenkette verknüpften D-Lysin am *C*-Terminus wurde ein deutlicher Affinitätsverlust (Faktor > 1000) zu allen drei Proteasen festgestellt. Die Verbindung **54** besitzt im Vergleich zur Leitstruktur zwei zusätzliche geladene Gruppen: Die Carboxylgruppe am *C*- und die Aminogruppe am *N*-Terminus. Möglicherweise führt die negative Ladung (bei physiologischem pH) des *C*-Terminus zu Abstoßungseffekten mit dem negativ geladenen D129 am Boden der S1-Tasche. Um eine bessere Vergleichbarkeit zur Referenzverbindung **42**, die wegen der amidischen Verknüpfung des P1-Rests mit

Verbindungen **54** und **L-1** weder in großem Maße zur Affinität beiträgt noch einen störenden Effekt hat. Schließlich wurde die Verbindung **L-3** mit einem C-terminalen Homoagmatin synthetisiert. Im Vergleich zu den Inhibitoren **L-1** und **L-2** mit C-terminalem Amid ist **L-3** weniger affin, im Vergleich zur Verbindung **54** mit Carbonsäurefunktion jedoch deutlich affiner.

Im Komplex mit der ZIKV-Protease liegen die Verbindungen **54**, **L-2** und **L-3** in der hufeisenförmigen Konformation vor, die für Verbindungen mit einer P1-Guanidinogruppe und einem Phenyllessigsäurederivat in P4-Position typisch ist (Abb. 3.7A-C). Die Ausrichtung des P3-P1-Segments der drei linearen Verbindungen und des Referenzinhibitors **42** gleichen einander (Überlagerung in Abb. 3.7D). Bezüglich der Ausrichtung des P4-Phenylrings unterscheiden sich die Inhibitoren **54** und **L-2** leicht voneinander (im Falle von **L-3** fehlt die Elektronendichte des Phenylrings). Ab der P4-Position fehlt die Elektronendichte der linearen Verbindungen, was ein Indiz für die Flexibilität des N-Terminus ist. Anhand der Positionierung der P4-Gruppe ist eine Ausrichtung des N-Terminus der linearen Verbindungen ins Lösungsmittel ohne spezifische Kontakte zum Enzym wahrscheinlich. Diese Vermutung würde auch den vernachlässigbaren Effekt, den der Austausch des Glycins gegen eine Acetylgruppe auf die Hemmwirkung hat, erklären. Die Carboxylgruppe der Verbindung **54** und die primäre Amidgruppe der Verbindung **L-2** sind nahezu identisch wie die Peptidbindung zwischen dem P ω - und dem P1-Rest der Leitstruktur **42** positioniert. Dadurch liegt die Carboxylfunktion der Verbindung **54** nahe an der Seitenkette des D129 (kürzester Abstand 4,1 Å). Die daraus resultierende elektrostatische Abstoßung könnte ein Grund für die vergleichsweise niedrige Affinität von **54** sein. Das primäre Amid von **L-2** bildet ähnliche wasservermittelte Wechselwirkungen wie die entsprechende Peptidbindung des Referenzinhibitors **42**. Die primäre Amidgruppe der Verbindung **L-2** ist im Vergleich zur P ω -P1-Amidbindung der Leitstruktur um 180° gedreht, d.h. bei Verbindung **L-2** zeigt der Stickstoff von der Enzymoberfläche weg.

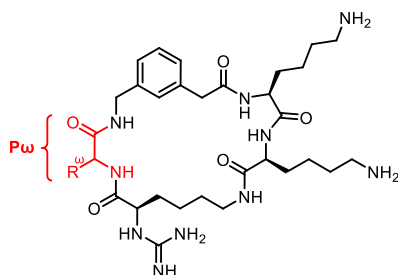
Mit Bezug auf die ursprüngliche Fragestellung nach dem Einfluss der Cyclisierung auf die Affinität ist festzustellen, dass wegen ihrer ungeladenen Endgruppen und der vergleichbaren Konformation im Komplex mit der ZIKV-Protease die Verbindung **L-2** am besten für einen Vergleich mit der Leitstruktur **42** geeignet ist. Demnach führt die Cyclisierung je nach Protease zu einer Affinitätssteigerung um den Faktor 6-10.

3.2 Einzelmodifikationen der Leitstruktur

3.2.1 P ω -Modifikationen

Wie im Kapitel 1.2.2.1 (S.15 ff.) beschrieben, führt der hydrophile Charakter mehrfach geladener peptidischer Inhibitoren zu einer geringen Membranpermeabilität und somit in der Regel zu einer geringen Wirkung in zellbasierten Assays.^{132,142-143,156,164} Der hydrophile Charakter der ersten cyclischen Flavivirininhibitoren (vgl. Kapitel 3.1.1, S.45 ff.) ist durch die basischen Reste in P1-, P2- und P3-Position stark ausgeprägt. Deshalb wurden in einer Serie P ω -modifizierter Derivate des Inhibitors **42** die Möglichkeiten zur Erhöhung der Lipophilie untersucht. Die hergestellten Derivate und deren Hemmkonstanten sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Um die Lipophilie der Inhibitoren qualitativ abschätzen zu können, ist außerdem die HPLC-Retentionszeit (in % B, vgl. Kap. 5.1, S.154) angegeben.

Tabelle 3.5 P ω -modifizierte Derivate der Leitstruktur **42**. Die Verbindungen **55** und **56** wurden von D. ROGGE (AG STEINMETZER) synthetisiert. Die Messungen mit der DENV4-Protease wurden von Mitarbeitern der AG LUO durchgeführt.



Nr.	P ω	K _i [μM]			HPLC [%B]
		ZIKV-Protease	WNV-Protease	DENV4-Protease	
42	Gly	0,00168 ± 0,00036	0,149 ± 0,050	0,142 ± 0,010	17,0
55	Ala	0,0182 ± 0,0051	1,39 ± 0,32	3,60 ± 0,38	18,6
56	D-Ala	0,00352 ± 0,00109	0,237 ± 0,021	0,125 ± 0,004	18,0
C-3	Val	0,0428 ± 0,0022	6,71 ± 0,32	2,81 ± 0,18	22,0
C-4	D-Val	0,00774 ± 0,00066	0,439 ± 0,028	0,486 ± 0,027	21,6
C-5	D-Pro	0,0177 ± 0,0005	0,850 ± 0,068	4,08 ± 0,26	20,5
C-6	D-Leu	0,00953 ± 0,00038	0,276 ± 0,03	n.b.	24,9
C-7	D-Cha	0,00359 ± 0,00034	0,395 ± 0,032	n.b.	30,1
C-8	D-hCha	0,00233 ± 0,00009	0,219 ± 0,016	n.b.	34,1
C-9	D-Phe	0,00534 ± 0,00039	0,693 ± 0,043	n.b.	25,9
C-10	D-hPhe	0,00602 ± 0,00015	0,331 ± 0,005	n.b.	29,3

Als erste Derivate wurden die Verbindungen **55** und **56** sowie **C-3** und **C-4** synthetisiert, die Alanin bzw. Valin jeweils in L- bzw. D-Konfiguration enthalten. Anhand dieser Diastereomerenpaare wurde eine Präferenz für D-konfigurierte Reste festgestellt: Die Affinität der Inhibitoren mit D-konfiguriertem P ω -Rest ist je nach Protease 10- bis 20-fach höher als die Affinität des zugehörigen L-Analogons. Die K_i-Werte liegen im Falle der Verbindung **C-4** (D-Val) um einen Faktor 4 über dem der Leitstruktur **42**.

Die Affinität von **56** (D-Ala) zur ZIKV- und zur WNV-Protease ist dagegen kaum niedriger als die der Leitstruktur **42** (Faktor 2 bzw. 1,5); die Affinität zur DENV4-Protease ist sogar etwas höher. Da der Affinitätsverlust durch Einbau D-konfigurierter Aminosäuren also gering ausfällt, wurden einige weitere Inhibitoren mit hydrophoben D-Aminosäuren in P ω -Position synthetisiert (**C-5** bis **C-10**). Unter diesen zeigte das D-Homocyclohexylalanin-Derivat **C-8** die höchste Affinität zur ZIKV-Protease, die höchste Affinität zur WNV-Protease und die höchste Lipophilie.

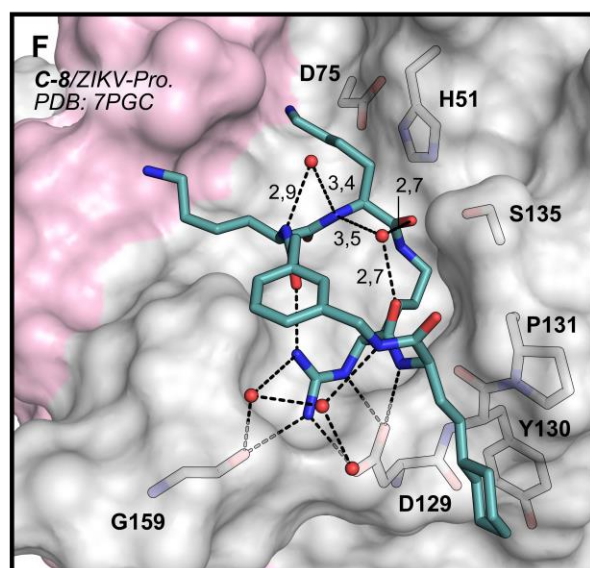
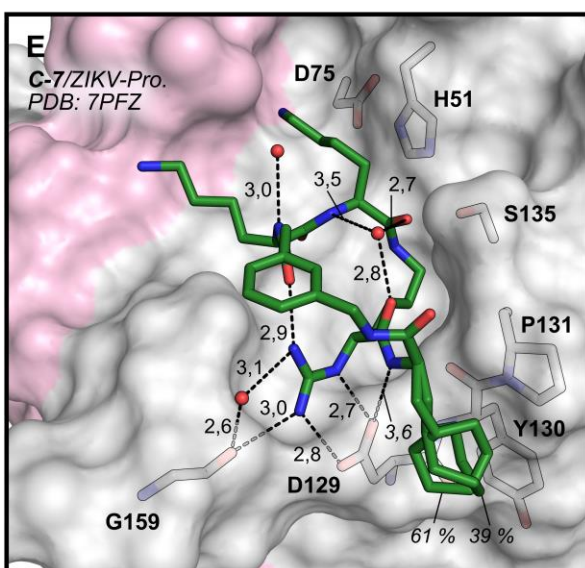
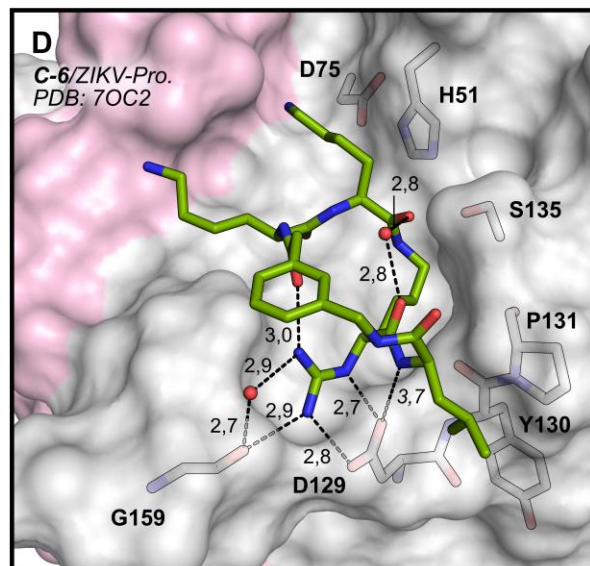
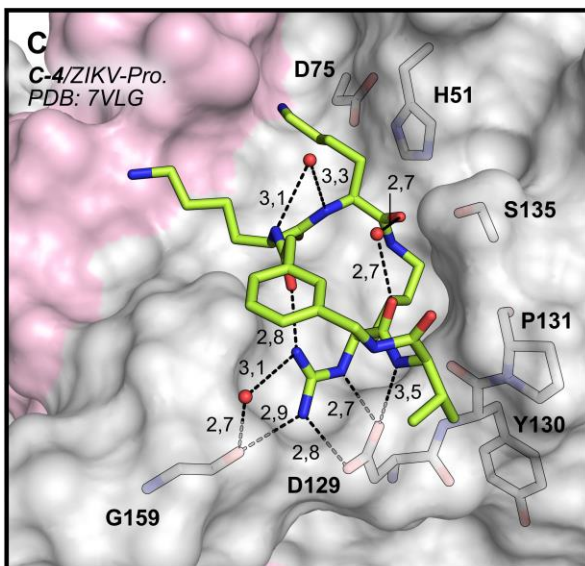
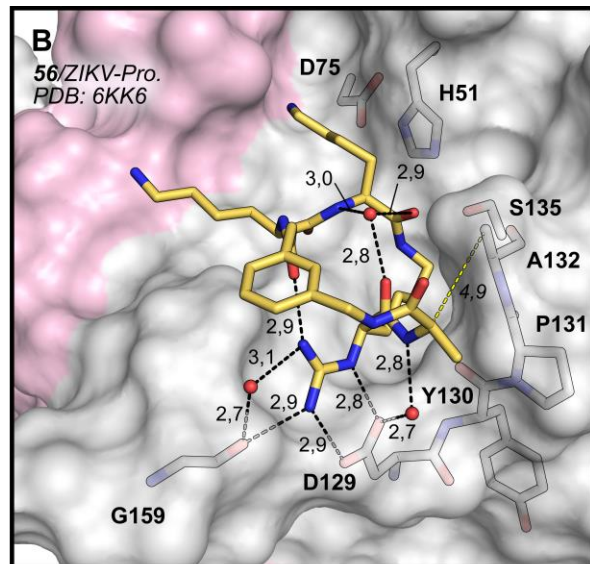
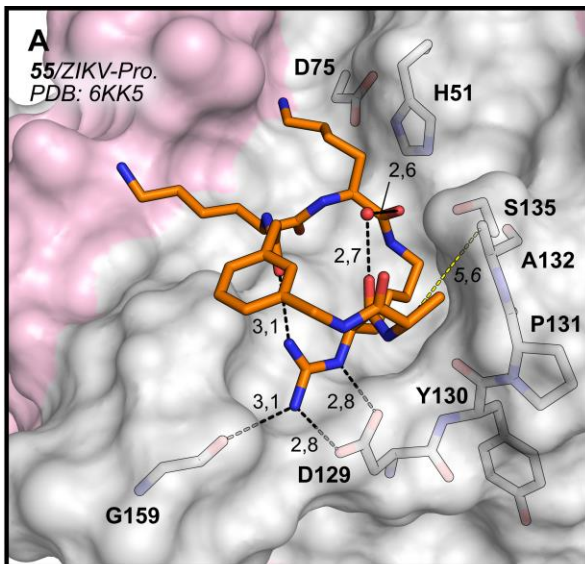
Von sechs der P ω -modifizierten Verbindungen (**55**, **56**, **C-4**, **C-6**, **C-7**, **C-8**) wurden Kristallstrukturen im Komplex mit der ZIKV-Protease bestimmt, anhand derer die aus Tabelle 3.5 hervorgehenden Tendenzen der Hemmwirkung verstanden werden können (Abb. 3.8, S.60-61). Grundsätzlich ähnelt der Bindungsmodus aller sechs Verbindungen dem der Leitstruktur **42** (vgl. Abb. 2.4, S.38; Abb. 2.5, S.40). Dies gilt besonders für das Rückgrat und die Seitenketten des P3-P1-Segments, weshalb die Wechselwirkungen zwischen diesen und dem Enzym der Übersichtlichkeit halber in Abbildung 3.8 nicht gezeigt sind. Durch den Vergleich der Komplexstrukturen der Inhibitoren **55** (Ala) und **56** (D-Ala) wird der Grund für die höhere Affinität der Derivate mit D-konfiguriertem P ω -Rest deutlich (Abb. 3.8A und B): Im Falle des L-Derivats **55** zeigt die Seitenkette des P ω -Alanins in Richtung A132. Um einen sterischen Zusammenstoß zwischen den Seitenketten des P ω -Alanins und des A132 zu vermeiden, ist das P ω -Alanin des Inhibitors **55** im Vergleich zum P ω -Glycin der Leitstruktur **42** signifikant nach Westen verschoben. Der Abstand zwischen dem P ω -C α und dem A132-C β beträgt im Falle des Inhibitors **55** 5,6 Å, im Falle der Leitstruktur **42** 5,1 Å. Diese Verschiebung des P ω -Rests bewirkt auch eine veränderte Positionierung des P4-Rests, wie die Überlagerung in Abb. 3.8I zeigt. Die verschobene Konformation des Inhibitors **55** scheint weniger effektiv an das Enzym zu binden, woraus sich die vergleichsweise geringe Affinität erklärt. Analog kann auch die im Vergleich zu **55** geringere Affinität des Inhibitors **C-3** (Val) verstanden werden: Die sterisch anspruchsvollere Seitenkette des P ω -Valins zwingt den Inhibitor **C-3** in eine stärker verschobene Konformation, um einen sterischen Zusammenstoß mit A132 zu vermeiden. Dies resultiert offensichtlich in einer weniger effektiven Bindung. Die Abwesenheit wasservermittelter Wechselwirkung zu den Resten D129 und G159 in der Komplexstruktur des Inhibitors **55** ist möglicherweise der vergleichsweise niedrigen Auflösung geschuldet (**42**: 1,59 Å; **55**: 2,03 Å).

Beim Inhibitor **56** zeigt die Seitenkette des P ω -D-Alanins in Richtung des Lösungsmittels und belegt den Freiraum nahe den Resten Y130 und P131. Der Abstand zwischen dem P ω -C α und dem A132-C β beträgt hier 4,9 Å. Die Konformation des Inhibitors **56** unterscheidet sich auch im P ω -P4-Segment nicht wesentlich von der Leitstruktur **42** (Abb. 3.8I und J). Die wasservermittelte intramolekulare Wechselwirkung sowie die wasservermittelten intermolekularen Wechselwirkungen zu den Resten D129 und G159, die bei der Leitstruktur **42** beobachtet wurden, finden sich in der Komplexstruktur des Inhibitors **56** ebenfalls. Trotz der weitgehenden Übereinstimmung der Bindungsmodi ist die Affinität von **56** zur ZIKV- und zur WNV-Protease etwas niedriger als die der Leitstruktur **42**. Eine plausible

Ursache für diesen leichten Affinitätsverlust ist die thermodynamisch ungünstige Verdrängung von Wassermolekülen durch die P ω -Seitenkette bei der Bindung an die Protease.

Die jeweilige Konformation der Inhibitoren **C-4**, **C-6**, **C-7** und **C-8** im Komplex mit der ZIKV-Protease gleicht im Wesentlichen der des D-Alanin-Derivats **56** (Abb. 3.8C-F). Einige Unterschiede, die mit den unterschiedlichen K_i -Werten dieser Verbindungen korrelieren, sind jedoch festzustellen und sollen im Folgenden näher beschrieben werden. Erstens unterscheidet sich die intramolekulare wasservermittelte Wechselwirkung von Verbindung zu Verbindung leicht. Die Seitenkette des P ω -Restes besetzt zweitens in allen Fällen den Freiraum im Bereich der Reste D129, Y130 und P131; der sterische Anspruch der P ω -Seitenketten führt zu einer leichten Verschiebung des P ω -Restes hin zum D129, sodass eine direkte, wenn auch schwache, polare Interaktion zwischen D129 und der P ω -NH-Gruppe auftritt. Der Abstand zwischen dem P ω -NH und dem Carboxylatsauerstoff ist allerdings mit 3,5-3,7 Å recht groß. Im Falle des D-Alanin-Derivats **56** (Abb. 3.8B) und der Leitstruktur **42** wird die Wechselwirkung zwischen der D129-Seitenkette und der P ω -NH-Gruppe über ein Wassermolekül vermittelt. An der entsprechenden Stelle findet sich in keiner der Komplexstrukturen mit **C-4**, **C-6**, **C-7** bzw. **C-8** ein Wassermolekül, da dort der entsprechende Raum jeweils durch die hydrophobe P ω -Seitenkette belegt wird. Die Kippung des P ω -Restes der Inhibitoren **C-4**, **C-6**, **C-7** und **C-8** (in Abb. 3.8 mit grünen bzw. blauen Kohlenstoffatomen gezeigt) hin zur D129-Seitenkette ist in der Überlagerung in Abbildung 3.8J zu erkennen. Eine Besonderheit des Inhibitors **C-8** (D-hCha) ist die Ausbildung eines Netzwerks aus drei Wassermolekülen, das die Enzymreste D129 und G159 mit dem P1-Guanidin und der P4-NH-Gruppe verbindet (Abb. 3.8G). Ein solches Netzwerk wurde für die verwandten Verbindungen **C-4**, **C-6** und **C-7** nicht gefunden, obwohl die Auflösungen der Komplexstrukturen der Inhibitoren **C-6** (1.50 Å) und **C-7** (1.45 Å) etwas höher als die der Komplexstruktur von **C-8** (1.55 Å) sind. Es ist also nicht davon auszugehen, dass die unterschiedlichen Auflösungen die Ursache dafür sind, dass das beschriebene Wassernetzwerk nur in der Komplexstruktur des Inhibitors **C-8** beobachtet wurde.

Werden die Inhibitoren unter der oben für das D-Alanin-Derivat **56** aufgestellten Prämisse der thermodynamisch ungünstigen Wasserverdrängung betrachtet, so ist ein mit dem sterischen Anspruch der P ω -Seitenkette steigender K_i -Wert zu erwarten. Zwar wird diese Erwartung für das D-Valin-Derivat **C-4** und das D-Leucin-Derivat **C-6** noch erfüllt, das D-Homocyclohexylalanin-Derivat **C-8** ist aber wider diese Erwartung deutlich affiner als **C-4** und kaum weniger wirksam als die Leitstruktur **42**. Ursache für den Affinitätsgewinn des Inhibitors **C-8** ist vermutlich die Ausbildung mehrerer Van-der-Waals-Kontakte zu den Resten D129, Y130 und P131 (Abb. 3.8H), die den durch die Wasserverdrängung hervorgerufenen Affinitätsverlust ausgleichen. Bei den Verbindungen **C-6** und **C-7** bestehen offensichtlich proteasespezifische Unterschiede, da **C-7** (D-Cha) die ZIKV-Protease effektiver hemmt als **C-6** (D-Leu), während es bei der Hemmung der WNV-Protease genau umgekehrt ist.



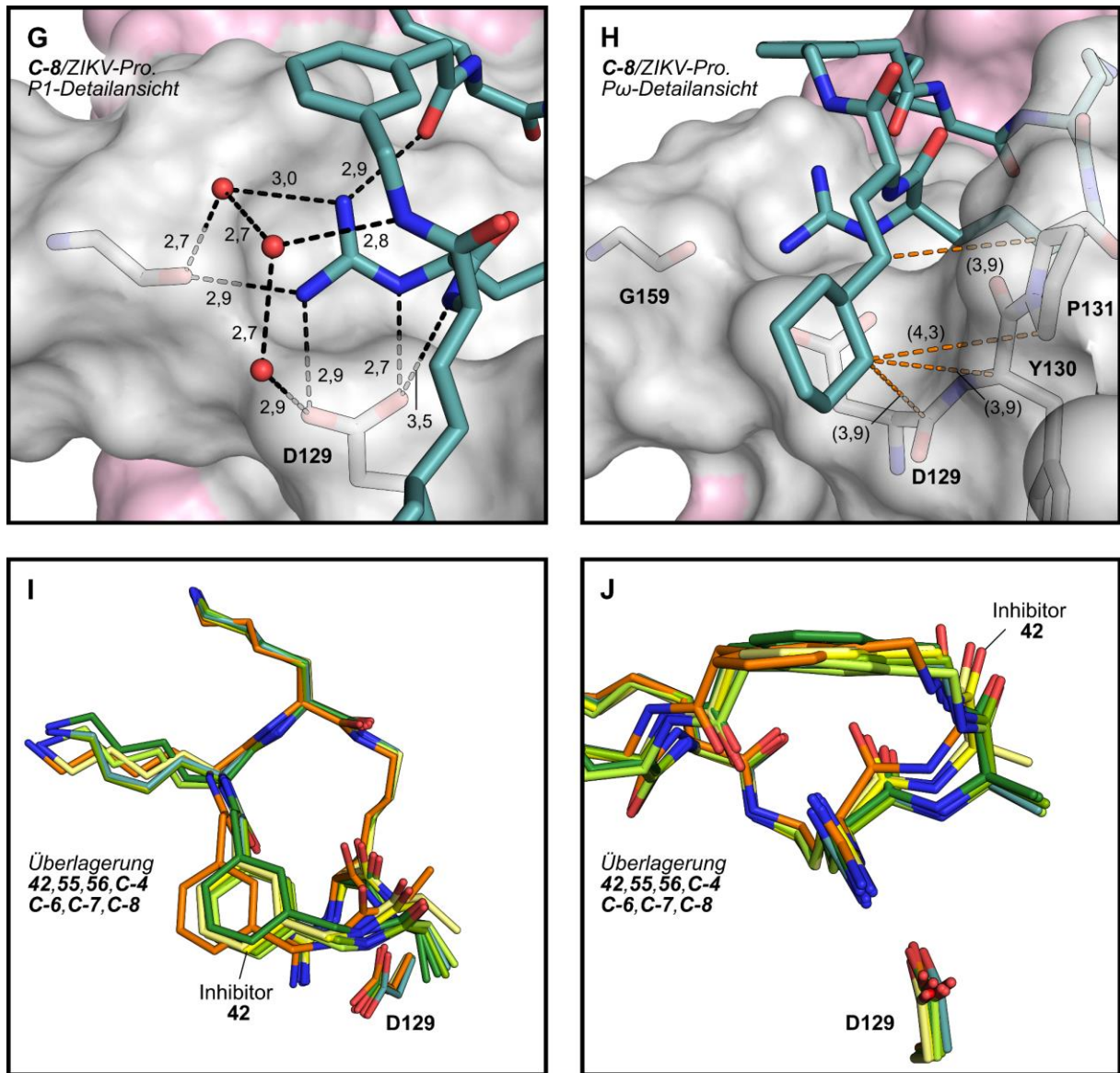


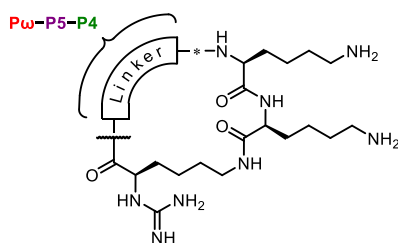
Abbildung 3.8 Kristallstrukturen P ω -modifizierter Derivate im Komplex mit der ZIKV-Protease. Interaktionen der P3- und der P2-Seitenkette und des Inhibitorrückgrats mit dem Enzym sind nicht gezeigt. (A) Inhibitor 55 im Komplex mit der ZIKV-Protease. (B) Inhibitor 56 im Komplex mit der ZIKV-Protease. (C) Inhibitor C-4 im Komplex mit der ZIKV-Protease. (D) Inhibitor C-6 im Komplex mit der ZIKV-Protease. (E) Inhibitor C-7 im Komplex mit der ZIKV-Protease. (F) Inhibitor C-8 im Komplex mit der ZIKV-Protease. (G) P1-Detailansicht aus der Komplexstruktur des Inhibitors C-8. (H) P ω -Detailansicht aus der Komplexstruktur des Inhibitors C-8. (I) und (J) Überlagerung der Inhibitoren aus den Tafeln A bis F mit der Leitstruktur 42. In den Tafeln I und J ist die Leitstruktur 42 mit Kohlenstoffatomen in Gelb dargestellt, die Farben der übrigen Inhibitoren entsprechen denen der Tafeln A bis F; in den Überlagerungen sind die P ω -Reste zur Wahrung der Übersichtlichkeit ab dem C γ nicht gezeigt. Auflösungen: (A) 2,03 Å; (B) 1,74 Å; (C) 1,77 Å; (D) 1,50 Å; (E) 1,45 Å; (F) 1,55 Å. Die Röntgenstrukturanalyse wurde von Mitarbeitern der AG LUO (Tafeln A-C) bzw. S. HUBER (AG STEINMETZER, Tafeln D-F) durchgeführt.

3.2.2 P4-Modifikationen

3.2.2.1 Derivate des Inhibitors **42** mit linearem Linkersegment

Ausgehend von der Leitstruktur **42** wurde eine Serie von Derivaten mit variiertem P4-Rest hergestellt und die Hemmwirkung jeder Verbindung auf die ZIKV-, WNV- und DENV4-Protease bestimmt (Tab. 3.6). Das Ziel war dabei die Identifizierung von Alternativen zur 3-Amphac-Gruppe, die ein einfaches Testen verschiedener Funktionalitäten und Substitutionsmuster in der P4-Position erlauben. 3-Amphac ist ein nur aufwendig zugänglicher und daher kostspieliger Baustein; Derivate dieser Aminosäure sind außerdem nur mit einem hohen synthetischen Aufwand zugänglich.

Tabelle 3.6 Derivate des Inhibitors **42** mit linearem Linkersegment. Die Messungen mit der DENV4-Protease wurden von Mitarbeitern der AG Luo durchgeführt.



Nr.	n ^a	P ω	P5	P4	K _i [μM]			HPLC [%B]
					ZIKV-Pro.	WNV-Pro.	DENV4-Pro.	
42	23	Gly	-	3-Amphac	0,00168 ± 0,00036	0,149 ± 0,050	0,142 ± 0,010	17,0
C-11	23	Gly	-	ε-Aca	0,0154 ± 0,0026	0,973 ± 0,173	1,99 ± 0,09	14,5
C-12	22	Gly	-	δ-Ava	0,0167 ± 0,0034	1,22 ± 0,02	1,12 ± 0,05	13,2
C-13	21	Gly	-	γ-Abu	0,124 ± 0,008	6,70 ± 0,52	6,09 ± 0,47	12,5
C-14^b	23	Gly	Gly	β-Ala	0,00172 ± 0,00003	0,0686 ± 0,0131	0,160 ± 0,005	11,9
C-15	23	Gly	β-Ala	Gly	0,00735 ± 0,00039	0,468 ± 0,003	0,815 ± 0,079	12,6
C-16	22	Gly	Gly	Gly	0,00374 ± 0,00020	0,129 ± 0,007	0,378 ± 0,027	12,0
C-17	23	β-Ala	Gly	Gly	0,0128 ± 0,0005	0,974 ± 0,134	2,72 ± 0,19	11,8

^an: Anzahl der Atome im Makrocyclus; ^bDENV2-Pro.: K_i = 3,82 μM ± 0,03 μM.

Die Derivate **C-11** bis **C-13** wurden synthetisiert, um zu untersuchen, ob sich lineare Aminosäuren als 3-Amphac-Ersatz eignen. Die Affinität der Derivate **C-11** (P4-ε-Aca) und **C-12** (P4-δ-Ava) zu allen drei Proteasen liegt ungefähr eine Größenordnung niedriger als die der Leitstruktur **42**; der Affinitätsverlust fällt beim kürzeren Derivat **C-13** (P4-γ-Abu) noch höher aus. Es zeigt sich erneut, dass die Zahl von 23 Ringatomen im Makrocyclus günstig für die Hemmung der ZIKV- und der WNV-Protease ist (vgl. Tab. 3.2, S.47). Die DENV4-Protease wird abweichend durch **C-12** (22 Ringatome) etwas effektiver gehemmt als durch **C-11** (23 Ringatome). Die im Vergleich zur Leitstruktur **42** geringere Hemmwirkung der Verbindungen **C-11**, **C-12** und **C-13** liegt vermutlich in der erhöhten Flexibilität des P4-Segments

begründet, was bei der Bindung an die Protease in einem erhöhten Entropieverlust resultiert. Des Weiteren ist die Ausbildung einer Kation- π -Wechselwirkung mit dem P1-Guanidin, wie sie bei Inhibitoren mit aromatischem P4-Rest auftritt, bei den Derivaten **C-11**, **C-12** und **C-13** nicht möglich. Die Inhibitoren **C-14** bis **C-16** wurden mit einem weniger flexiblem Linkersegment synthetisiert. Strukturell unterscheiden sich diese von **C-11** bzw. **C-12** lediglich durch die Anwesenheit einer stabilisierenden Peptidbindung im Linker (diese Inhibitoren besitzen also einen P5-Rest). Für die Inhibitoren **C-14** bis **C-16** wurden niedrigere K_i -Werte als für die Verbindungen **C-11** und **C-12** bestimmt. Besonders hervorzuheben ist der Inhibitor **C-14** (P5-Gly, P4- β -Ala): Die ZIKV- und die DENV4-Protease werden durch diesen genauso effektiv gehemmt wie durch die Leitstruktur **42**; die WNV-Protease wird sogar um einen Faktor 2 effektiver gehemmt. Am Derivat **C-17** zeigt sich, dass die Kombination aus einem 23-gliedrigen Ring und β -Alanin als P ω -Rest ungünstig ist, was bereits am Inhibitor **C-2** demonstriert wurde (vgl. Tab. 3.2, S.47).

Von den Inhibitoren **C-14** bis **C-16** wurden Kristallstrukturen im Komplex mit der ZIKV-Protease bestimmt (Abb. 3.9, S.64). In allen drei Fällen unterscheidet sich die Konformation des P3-P1-Segments nicht wesentlich von dem der Leitstruktur **42** (vgl. Abb. 2.5, S.40). Aus dem Vergleich der Komplexstrukturen der Verbindungen **C-14** und **C-15**, welche sich nur bezüglich der Position der Peptidbindung zwischen dem P5- und P4-Rest unterscheiden, erschließt sich der Grund für die unterschiedlich starke Hemmwirkung dieser beiden Inhibitoren. In der gebundenen Form des Inhibitors **C-14** sind die drei Carbonylgruppen (P ω , P5, P4) des Linkersegments klauenartig um die P1-Guanidinogruppe positioniert und sind über intramolekulare Wasserstoffbrücken an diese gebunden (Abb. 3.9A). Beim Inhibitor **C-15** erlaubt die Anordnung der Carbonylgruppen des Linkersegments nur die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke zwischen dem P4-Carbonylsauerstoff und dem P1-Guanidin (Abb. 3.9B). Die Stabilisierung der gebundenen Konformation des Inhibitors **C-14** ist vermutlich die Ursache für dessen effektivere Hemmwirkung. Bemerkenswerterweise ist die Distanz zwischen dem P1-Guanidin und G159 (3,6 Å bzw. 3,5 Å) bei beiden Derivaten deutlich länger als bei der Leitstruktur **42** (3,0 Å), weshalb allenfalls von einer schwachen polaren Interaktion ausgegangen werden kann. Es ist außerdem bemerkenswert, dass zwischen dem P4-Carbonylsauerstoff und dem P1-Guanidin des sehr wirksamen Inhibitors **C-16** (Gly-Gly-Gly als P ω -P5-P4-Segment) keine intramolekulare Interaktion vorliegt (Abb. 3.9C). Eine solche intramolekulare Wechselwirkung wurde bei allen anderen in dieser Arbeit vorgestellten Komplexstrukturen beobachtet. In der Literatur ist eine solche Wechselwirkung ebenfalls ausnahmslos für alle Liganden beschrieben, die an der Seitenkette des P1-Rests ein terminales Guanidin besitzen und einen P4-Rest enthalten. Umso bemerkenswerter ist, dass der Inhibitor **C-16** dennoch eine sehr starke Hemmwirkung zeigt. Das Fehlen wasservermittelter Wechselwirkungen in den Komplexstrukturen der Verbindungen **C-14** und **C-16** ist möglicherweise eine Folge der vergleichsweise niedrigen Auflösung.

Die Verbindungen **C-14** und **C-16** besitzen im Vergleich zur Leitstruktur **42** eine etwas stärkere Hemmwirkung auf die WNV-Protease. Da keine Affinitätssteigerung zur ZIKV- und zur DENV4-Protease vorliegt, muss sich die Ursache dieser unterschiedlichen Tendenzen aus der Beschaffenheit der aktiven Zentren ergeben. Eine plausible Erklärung liefert die bereits in Kapitel 1.2.2.1 (S.27-28) diskutierte Größe des Freiraums zwischen den NS3-Resten 132 und 155. Die WNV-Protease besitzt in Position 132 ein Threonin und in Position 155 ein Isoleucin. Damit ist das aktive Zentrum der WNV-Protease im S3/4-Bereich etwas schmaler als bei den anderen Proteasen (ZIKV-Pro.: A132, V155; DENV4-Pro.: P132, V155), weshalb eine Verschlangung des Linkersegments nur die Affinität zur WNV-Protease erhöht.

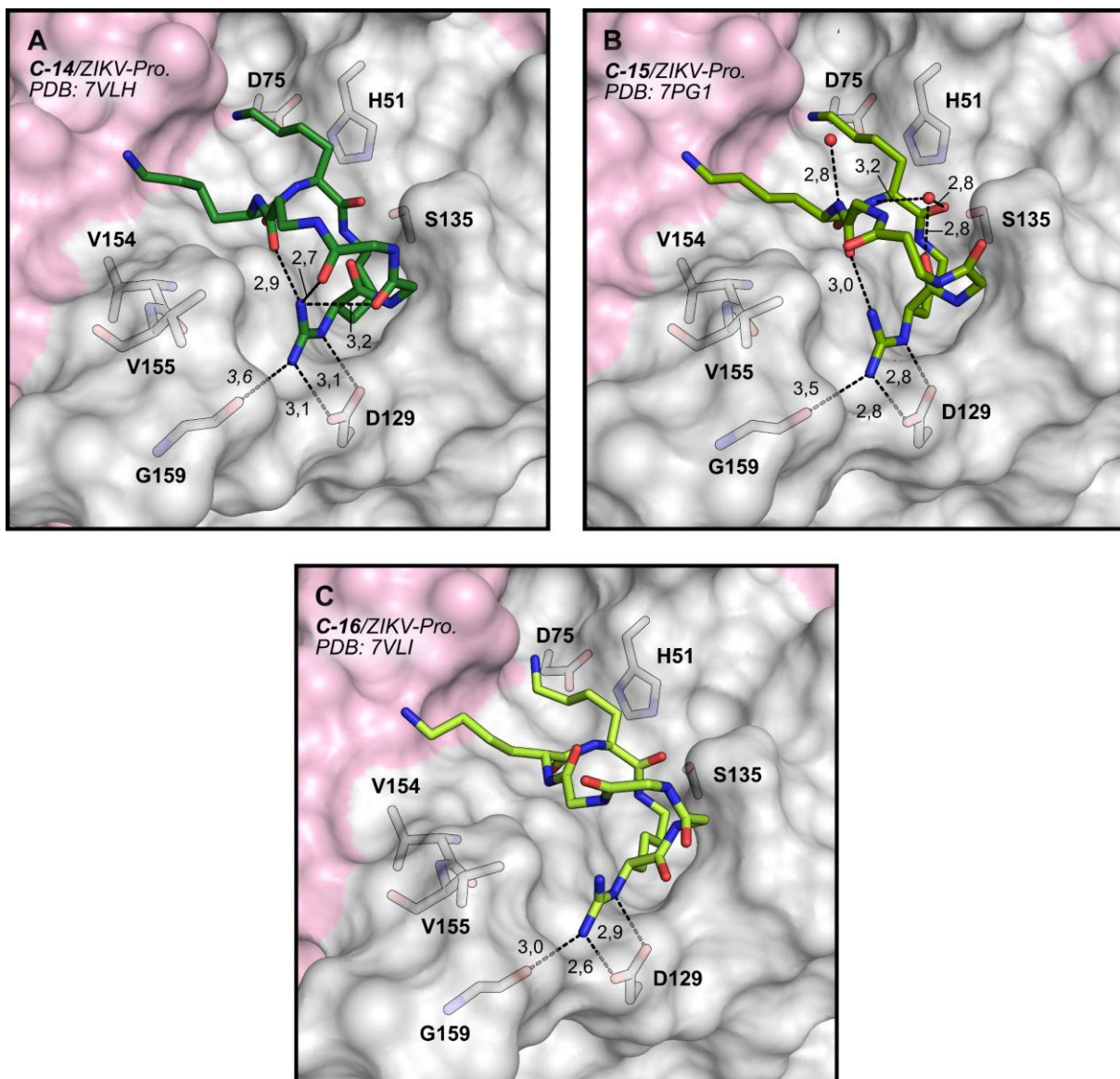


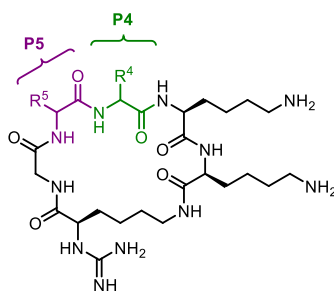
Abbildung 3.9 Komplexkristallstrukturen von Inhibitoren mit linearem Linkersegment. Interaktionen des P3- und des P2-Rests und des Inhibitorrückgrats mit dem Enzym sind nicht gezeigt. (A) Inhibitor **C-14** im Komplex mit der ZIKV-Protease. (B) Inhibitor **C-15** im Komplex mit der ZIKV-Protease. (C) Inhibitor **C-16** im Komplex mit der ZIKV-Protease. Auflösungen: (A) 2,62 Å; (B) 1,95 Å; (C) 2,39 Å. Das Fehlen des Wassernetzwerks ist möglicherweise der niedrigen Auflösung geschuldet. Röntgenstrukturanalyse durch Mitarbeiter der AG LUO (Tafeln A, C) bzw. S. HUBER (AG STEINMETZER, Tafel B).

Mit den Inhibitoren **C-14**, **C-15** und **C-16** wurden drei Verbindungen identifiziert, die den am Beginn des Kapitels gestellten Anforderungen genügen: Eine hohe Affinität zur ZIKV-, WNV- und DENV4-Protease und eine leichte Zugänglichkeit zu Derivaten mit verändertem P4-Rest bzw. verändertem P5-P4-Segment: Durch Austausch der P5- oder der P4-Aminosäure gegen verzweigte α - bzw. β -Aminosäuren sind weitere Derivate von **C-14**, **C-15** und **C-16** bequem zugänglich. Die Komplexstrukturen dieser Verbindungen erlauben außerdem eine rationale Entwicklung neuer Derivate. In allen drei Fällen liegt der P4-Rest jeweils nahe an den hydrophoben Seitenketten der NS3-Reste V154 und V155. Deshalb sollten durch den Einbau von Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten in P4-Position die Reste V154 und V155 adressiert werden können. Die gegebene Geometrie der Inhibitoren in ihrer gebundenen Konformation beachtend müssten dafür bei Derivaten der Inhibitoren **C-14** und **C-15** D-konfigurierte P4-Reste eingebaut werden, im Falle von Derivaten des Inhibitors **C-16** L-konfigurierte P4-Reste. Solche Derivate des Inhibitors **C-16** müssten wegen der Ausrichtung des P4-Rests in einer anderen Konformation an die ZIKV-Protease binden als die Ausgangsverbindung **C-16**, um einen sterischen Zusammenstoß zwischen dem Enzym und der P4-Seitenkette zu verhindern. Bei Derivaten der Inhibitoren **C-14** und **C-15** hingegen ist auf den ersten Blick nicht mit einer Konformationsänderung durch die Anwesenheit einer P4-Seitenkette zu rechnen.

Ausgehend von **C-14**, **C-15** und **C-16** ist auch die Entwicklung von P5-modifizierten Derivaten denkbar. Da der P5-Rest aller drei Verbindungen ins Lösungsmittel ragt, sind spezifische Adressierungsmöglichkeiten kaum gegeben und die Vorhersage der Stereopräferenz ist entsprechend schwierig.

3.2.2.2 Derivate der Inhibitoren **C-14**, **C-15** und **C-16**

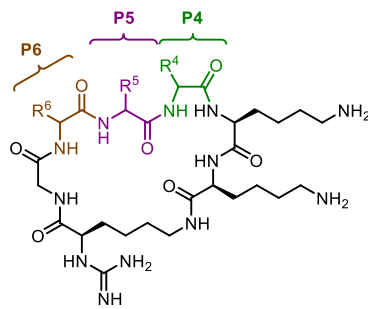
Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, sind ausgehend von den Inhibitoren **C-14**, **C-15** und **C-16** durch Austausch des Glycins oder des β -Alanins in P5- bzw. P4-Position Derivate mit modifiziertem Linkersegment leicht zugänglich. Zunächst wurden auf Basis des Inhibitors **C-16** (Gly-Gly als P5-P4-Segment) die Verbindungen **C-18** bis **C-23** hergestellt und enzymkinetisch mit der ZIKV- und der WNV-Protease charakterisiert (Tab. 3.7, S.66). An den Inhibitoren **C-18** bis **C-21** wurde eine Präferenz für L-konfigurierte P4-Reste festgestellt. Diese Präferenz war aufgrund der Konformation des Inhibitors **C-16** im Komplex mit der ZIKV-Protease bereits im vorigen Abschnitt vermutet worden. Die Hypothese, dass bei Vorhandensein von P4-Seitenketten bei Bindung an die Protease eine gegenüber **C-16** veränderte Konformation eingenommen werden muss, lässt sich an den K_i -Werten der Verbindungen **C-18** bis **C-21** bestätigen: Die K_i -Werte der vier Derivate liegen höher als diejenigen des Inhibitors **C-16**. Beim Einbau von L- bzw. D-Phenylalanin in P5-Position (**C-22**, **C-23**) besteht eine leichte Präferenz für D-Phenylalanin: Das D-Derivat **C-23** zeigt eine um einen Faktor 3,5 bzw. 4,5 stärkere Hemmwirkung als sein L-Analogon **C-22**; allerdings ist die Hemmwirkung beider Derivate geringer als die der Ausgangsverbindung **C-16**.

Tabelle 3.7 Derivate des Inhibitors **C-16** mit variiertem P5- oder P4-Rest.

Nr.	P5	P4	K_i [μ M]		HPLC [%B]
			ZIKV-Pro.	WNV-Pro.	
C-16	Gly	Gly	$0,00374 \pm 0,00020$	$0,129 \pm 0,007$	12,0
C-18	Gly	Ala	$0,0922 \pm 0,010$	$1,17 \pm 0,05$	13,4
C-19	Gly	D-Ala	$0,187 \pm 0,016$	$6,97 \pm 0,09$	13,3
C-20	Gly	Phe	$0,0319 \pm 0,0022$	$0,657 \pm 0,018$	21,8
C-21	Gly	D-Phe	$0,139 \pm 0,020$	$17,3 \pm 1,0$	20,1
C-22	Phe	Gly	$0,0576 \pm 0,0031$	$4,07 \pm 0,28$	20,7
C-23	D-Phe	Gly	$0,0169 \pm 0,0005$	$0,908 \pm 0,029$	20,9

Ebenfalls auf Basis des Inhibitors **C-16** wurden die Verbindungen **C-24** bis **C-31** entwickelt (Tab. 3.8). Bei diesen Verbindungen wurde das Linkersegment um eine α -Aminosäure erweitert, sodass jeweils ein P6-Rest vorhanden ist. Diese Ringvergrößerung um eine Aminosäure geschah vor allem im Hinblick auf die mögliche Entwicklung zellpenetrierender Inhibitoren. Ein gängiges Motiv cyclischer zellpenetrierender Peptide ist eine Oligo-Arginin-Sequenz, die an ein Segment aus wenigstens zwei hydrophoben Aminosäuren gekuppelt ist. Häufig sind diese Peptide aus sieben bis acht Resten aufgebaut.^{165,176-177} Durch den Einbau eines P6-Rests handelt es sich bei den Derivaten **C-24** bis **C-31** um cyclische Heptapeptide. Ebenfalls im Hinblick auf die mögliche Entwicklung zellpenetrierender Inhibitoren wurde durch den Einbau von L- bzw. D-Phenylalanin überprüft, inwiefern und mit welcher Stereopräferenz hydrophobe Seitenketten in P6-, P5-, und P4-Position toleriert werden.

Vom Inhibitor **C-25** wurde eine Kristallstruktur im Komplex mit der ZIKV-Protease bestimmt (Abb. 3.10A). Die Konformation des P3-P1-Segments unterscheidet sich nicht wesentlich von der der Leitstruktur **42** und des Inhibitors **C-16**. Die Positionierung und die Konformation des Linkers unterscheiden sich allerdings wesentlich von den bisher beobachteten (Abb. 3.10B): Üblicherweise, wie bei der Leitstruktur **42** oder dem Inhibitor **C-16**, beschreibt das Linkersegment einen Bogen oberhalb des P1-Guanidins. Beim Inhibitor **C-25** beschreibt der Linker ebenfalls einen Bogen, dieser liegt jedoch direkt oberhalb des P3-P1-Rückgrats. Diese Konformation wird durch drei intramolekulare, polare Wechselwirkungen stabilisiert: Durch die auch bei anderen Inhibitoren häufig beobachtete Wasserstoffbrücke zwischen dem P1-Guanidin und dem P4-Carbonylsauerstoff sowie durch

Tabelle 3.8 Inhibitoren mit Linkersegmenten aus vier α -Aminosäuren.

Nr.	P6	P5	P4	K_i [μ M]		HPLC [%B]
				ZIKV-Pro.	WNV-Pro.	
C-24	Gly	Gly	Phe	0,315 \pm 0,022	5,93 \pm 0,80	20,9
C-25	Gly	Gly	D-Phe	0,0144 \pm 0,0015	1,74 \pm 0,04	19,4
C-26	Gly	Phe	Gly	0,145 \pm 0,005	3,32 \pm 0,11	20,7
C-27	Gly	D-Phe	Gly	0,204 \pm 0,004	3,43 \pm 0,18	20,3
C-28	Phe	Gly	Gly	0,0399 \pm 0,0062	2,04 \pm 0,10	20,6
C-29	D-Phe	Gly	Gly	0,0171 \pm 0,0004	1,32 \pm 0,04	20,7
C-30	Gly	Gly	Arg	0,0699 \pm 0,0017	5,30 \pm 0,05	12,8
C-31	Gly	Gly	D-Arg	0,00862 \pm 0,00028	1,22 \pm 0,03	12,6

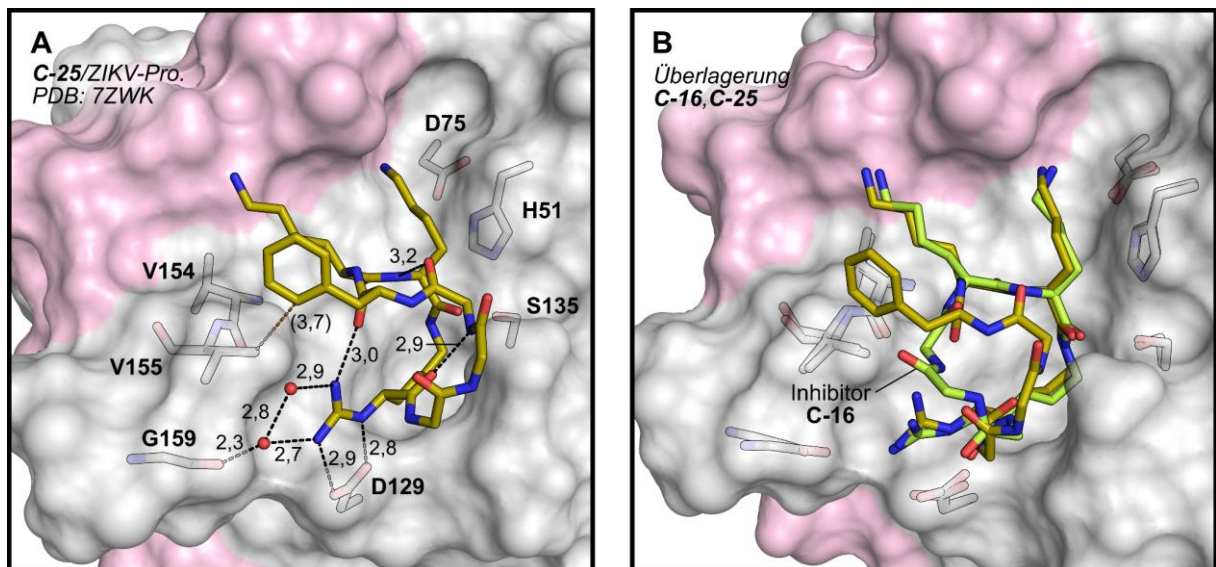


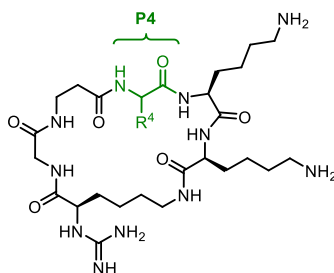
Abbildung 3.10 (A) Kristallstruktur des Inhibitors **C-25** im Komplex mit der ZIKV-Protease. Auflösung: 2,00 Å. Interaktionen des P3- und des P2-Rests und des Inhibitorrückgrats mit dem Enzym sind nicht gezeigt. **(B)** Überlagerung der Komplexstrukturen der Inhibitoren **C-16** und **C-25**. Die Enzymoberfläche in Tafel B ist der Komplexstruktur von **C-25** entnommen. Röntgenstrukturanalyse durch S. HUBER (AG STEINMETZER).

Wasserstoffbrücken vom amidischen P2-NH zum P5-Carbonylsauerstoff und vom P5-NH zum P1-Carbonylsauerstoff. Diese intramolekulare Stabilisierung ist sicherlich dafür verantwortlich, dass der Inhibitor **C-25** trotz der stark veränderten Konformation des Makrocyclus immer noch eine hohe

Affinität zur ZIKV-Protease hat. Wie im vorigen Abschnitt bereits spekuliert wurde, geht die P4-Seitenkette tatsächlich Van-der-Waals-Kontakte mit der Seitenkette von V155 ein, was vermutlich zur Affinität beiträgt. Eine weitere, bisher nicht beobachtete Neuerung ist die Wechselwirkung zwischen dem P1-Guanidin und G159. Bei den meisten Inhibitoren existieren zwischen der P1-Guanidinogruppe und dem Carbonylsauerstoff G159 eine direkte und eine wasservermittelte Wechselwirkung. (vgl. z.B. Abb. 2.5B, S.40). Beim Inhibitor **C-25** beträgt der Abstand vom Carbonylsauerstoff des G159 zum näheren N_ω des P1-Guanidins 4,3 Å, was für eine direkte polare Wechselwirkung zu groß ist. Allerdings ist der Freiraum zwischen G159 und dem P1-Guanidin durch ein zusätzliches Wassermolekül besetzt, sodass sich die in Abbildung 3.10A gezeigten wasservermittelten Wechselwirkungen ergeben.

In einer weiteren Serie wurden Derivate des Inhibitors **C-15** (P5-β-Ala) hergestellt (Tab. 3.9). Dabei wurde nur der P4-Rest variiert. Da diese Serie mit dem Ziel entwickelt wurde, die Seitenketten von V154 oder V155 zu adressieren, wurden nur hydrophobe Aminosäuren als P4-Rest eingebaut.

Tabelle 3.9 Derivate des Inhibitors **C-15** mit variiertem P4-Rest.



Nr.	P4	K _i [μM]		HPLC [%B]
		ZIKV-Pro.	WNV-Pro.	
C-15	Gly	0,00735 ± 0,00039	0,468 ± 0,003	12,6
C-32	Ala	0,075 ± 0,003	7,76 ± 0,09	12,7
C-33	Val	0,340 ± 0,066	39,7 ± 2,9	16,6
C-34	Leu	0,124 ± 0,002	10,3 ± 0,3	19,6
C-35	D-Ala	0,00562 ± 0,00110	1,43 ± 0,17	13,4
C-36	D-Val	0,00826 ± 0,00205	1,68 ± 0,26	15,7
C-37	D-Leu	0,00430 ± 0,00024	1,03 ± 0,20	18,7
C-38	D-Nle	0,00494 ± 0,00029	0,892 ± 0,043	19,1
C-39	D-Cha	0,00694 ± 0,00058	0,735 ± 0,054	24,2
C-40	D-Pro	0,0210 ± 0,0028	2,59 ± 0,30	15,1
C-41	D-Phg	0,00484 ± 0,00014	0,371 ± 0,008	17,3
C-42	D-Phe	0,00306 ± 0,00149	1,92 ± 0,859	20,1
C-43	D-hPhe	0,0103 ± 0,0032	1,29 ± 0,538	23,1

Anhand der Verbindungen **C-32** bis **C-34** mit Alanin, Valin bzw. Leucin als P4-Rest sowie ihren D-Analoga **C-35** bis **C-37** wurde eine Präferenz für D-Aminosäuren in P4-Position festgestellt. Diese Tendenz war bereits auf Basis der Konformation von **C-15** im Komplex mit der ZIKV-Protease vermutet worden (vgl. Abb. 3.9B, S.64). Damit unterscheidet sich diese Tendenz wie erwartet von den Derivaten des Inhibitors **C-16**, die ein um eine Methylengruppe verkürztes Linkersegment besitzen und eine Präferenz für L-konfigurierte P4-Reste zeigen (vgl. Tab. 3.7, S.66). Die Inhibitoren **C-35** (D-Ala) und **C-37** (D-Leu) zeigen eine höhere Affinität zur ZIKV-Protease als die Ausgangsverbindung **C-15** (Gly). Um eine zusätzliche Erhöhung der Affinität zu erzielen, wurde eine Reihe weiterer Inhibitoren mit hydrophoben D-Aminosäuren in P4-Position synthetisiert (**C-38** bis **C-43**). Im Vergleich zum Glycin-Derivat **C-15** wurde bei den Inhibitoren **C-38** (D-Nle), **C-41** (D-Phg) und **C-42** (D-Phe) eine leichte Erhöhung der Affinität zur ZIKV-Protease festgestellt. Die höchste Affinität zur ZIKV-Protease hat dabei das D-Phenylalanin-Derivat **C-42**.

Obwohl die ZIKV-Protease von den in dieser Arbeit vorgestellten Inhibitoren deutlich effektiver gehemmt wird als die WNV-Protease, lässt sich in der Regel für beide Proteasen eine ähnliche Struktur-Wirkungs-Beziehung beobachten. Bei der Serie der **C-15**-Derivate findet sich eine interessante Abweichung von dieser Regel: Entweder erhöht sich die Hemmwirkung auf die ZIKV-Protease durch den Einbau hydrophober D-Aminosäuren als P4-Rest im Vergleich zum Glycin-Derivat **C-15** oder bleibt in der gleichen Größenordnung (eine Ausnahme bildet das D-Prolin-Derivat **C-40**). Bei der Hemmwirkung auf die WNV-Protease wird der gegenteilige Effekt beobachtet: Diese verringert sich beim Austausch des P4-Glycins gegen Reste mit Seitenketten. Diese Tendenz ist vermutlich auf das im Vergleich zur ZIKV-Protease schmalere aktive Zentrum der WNV-Protease zurückzuführen. Einzig das D-Phenylglycin-Derivat **C-41** zeigte eine etwas höhere Affinität zur WNV-Protease als die Ausgangsverbindung **C-15**.

Von vier Derivaten des Inhibitors **C-15** wurden Kristallstrukturen im Komplex mit der ZIKV-Protease bestimmt (Abb. 3.11, S.71). Aus diesen geht hervor, dass die Art des P4-Rests einen erheblichen Einfluss auf die Positionierung und die Konformation des gesamten Linkersegments ausübt. Nähme die Verbindung **C-33** mit L-Valin als P4-Rest in ihrer gebundenen Form die gleiche Rückgratkonformation ein wie **C-15** (vgl. Abb. 3.9B, S.64), so wäre zu erwarten, dass die Seitenkette des L-Valins vom Enzym weg ins Lösungsmittel ragt. Bedingt durch den hydrophoben Effekt wird diese Konformation in der tatsächlichen Komplexstruktur des Inhibitors **C-33** nicht beobachtet. Vielmehr ist die Seitenkette des P4-Valins direkt oberhalb der Seitenkette von V155 positioniert, sodass Van-der-Waals-Kontakte vorliegen (Abb. 3.11A). Diese Ausrichtung der P4-Seitenkette induziert Konformationsänderungen aller Reste mit Ausnahme des P2- und des P1-Rests (Abb. 3.11E). Am P4-Rest induziert die Valin-Seitenkette eine Rotation der Bindung zwischen dem C_α und dem N_α des P3-Rests (der Diederwinkel beträgt bei **C-33** 100°, bei **C-15** 132°). Dadurch wird die P4-P3-Peptidbindung derart verschoben, dass keine intramolekulare Wechselwirkung zwischen dem P4-Carbonylsauerstoff und dem P1-Guanidin

mehr vorliegt. Durch die Rotation wird auch die Seitenkette des P3-Lysins in eine von den übrigen Inhibitoren abweichende Konformation gezwungen, die zwar eine polare Wechselwirkung mit dem Carbonylsauerstoff von F84* zulässt, aber ungünstig für die Ausbildung einer Interaktion mit D83* ist. Die abweichende Konformation der P3-Seitenkette ermöglicht beim Inhibitor **C-33** die Bildung einer wasservermittelten Wechselwirkung mit der NH-Gruppe des V155. Ein weiterer Effekt der Rotation der zwischen dem C_α und dem N_α des P3-Rests ist die Teilnahme der amidischen P3-NH-Gruppe an der intramolekularen Stabilisierung, die im Falle des Inhibitors **C-33** über zwei Wassermoleküle vermittelt wird. Ähnliche wasservermittelte Stabilisierungen wurden bei den Komplexstrukturen der Inhibitoren **C-4** und **C-8** beobachtet (vgl. Abb. 3.8C und F, S.60), bei der Mehrzahl an Inhibitoren wurde jedoch nur eine Verbrückung über ein Wassermolekül gefunden. Des Weiteren wird die Konformation des Inhibitors **C-33** durch eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zwischen dem P5-Rest und dem P1-Guanidin stabilisiert. Im Ganzen führen all diese Konformationsänderungen zu einer weniger günstigen Interaktion mit dem Enzym, woraus sich die im Vergleich zum Glycin-Derivat **C-15** stark verringerte Affinität des Valin-Derivats **C-33** ergibt.

Auch auf den Einbau D-konfigurierter Aminosäuren in die P4-Position folgt eine Änderung der Linkerkonformation; das P3-P1-Segment bleibt dagegen im Vergleich zum Inhibitor **C-15** oder zur Leitstruktur **42** unverändert. Beim D-Alanin-Derivat **C-35** (Abb. 3.11B) ist das P5-β-Alanin im Vergleich zum P5-β-Alanin von **C-15** leicht nach Osten verschoben. Die kurze Seitenkette des P4-D-Alanins ist zwar oberhalb von V155 positioniert, der kürzeste Abstand zwischen diesen beiden Resten ist jedoch mit 5,1 Å zu lang für Van-der-Waals-Kontakte. Die im Vergleich zu **C-15** etwas erhöhte Affinität des Inhibitors **C-35** zur ZIKV-Protease ist daher auf die im Vergleich zum Glycin reduzierte Flexibilität des D-Alanin-Rückgrats zurückzuführen, aus der ein geringerer Entropieverlust bei der Bindung an das Enzym resultiert. Dass in der Komplexstruktur von **C-35** die wasservermittelte Wechselwirkung zum G159 sowie die intramolekulare wasservermittelte Wechselwirkung nicht beobachtet wurden, ist vermutlich der vergleichsweise niedrigen Auflösung (1,95 Å) geschuldet.

Abbildung 3.11 (S.71) Komplexkristallstrukturen P4-modifizierter Derivate des Inhibitors **C-15**. Interaktionen des P3-Rests sind nur in Tafel A gezeigt. Interaktionen des P2-Rests und des Inhibitorrückgrats mit dem Enzym sind nicht gezeigt. (A) Inhibitor **C-33** im Komplex mit der ZIKV-Protease. (B) Inhibitor **C-35** im Komplex mit der ZIKV-Protease. (C) Inhibitor **C-38** im Komplex mit der ZIKV-Protease. (D) Inhibitor **C-42** im Komplex mit der ZIKV-Protease. (E) Überlagerung der Komplexstrukturen der Inhibitoren **C-15**, **C-33** und **C-35**. (F) Überlagerung der Komplexstrukturen der Inhibitoren **C-15**, **C-38** und **C-42**. Die Farben der Inhibitor-Kohlenstoffatome in den Überlagerungen entsprechen denjenigen aus den Tafeln A-D. Die Abstände zwischen G159 und dem P1-Guanidin in den Tafeln A, B und D sind für direkte polare Wechselwirkungen zu lang und sind nur zu Vergleichszwecken angegeben. Auflösungen: (A) 1,38 Å; (B) 1,95 Å; (C) 1,45 Å; (D) 1,30 Å. Röntgenstrukturanalyse durch S. HUBER (AG STEINMETZER).

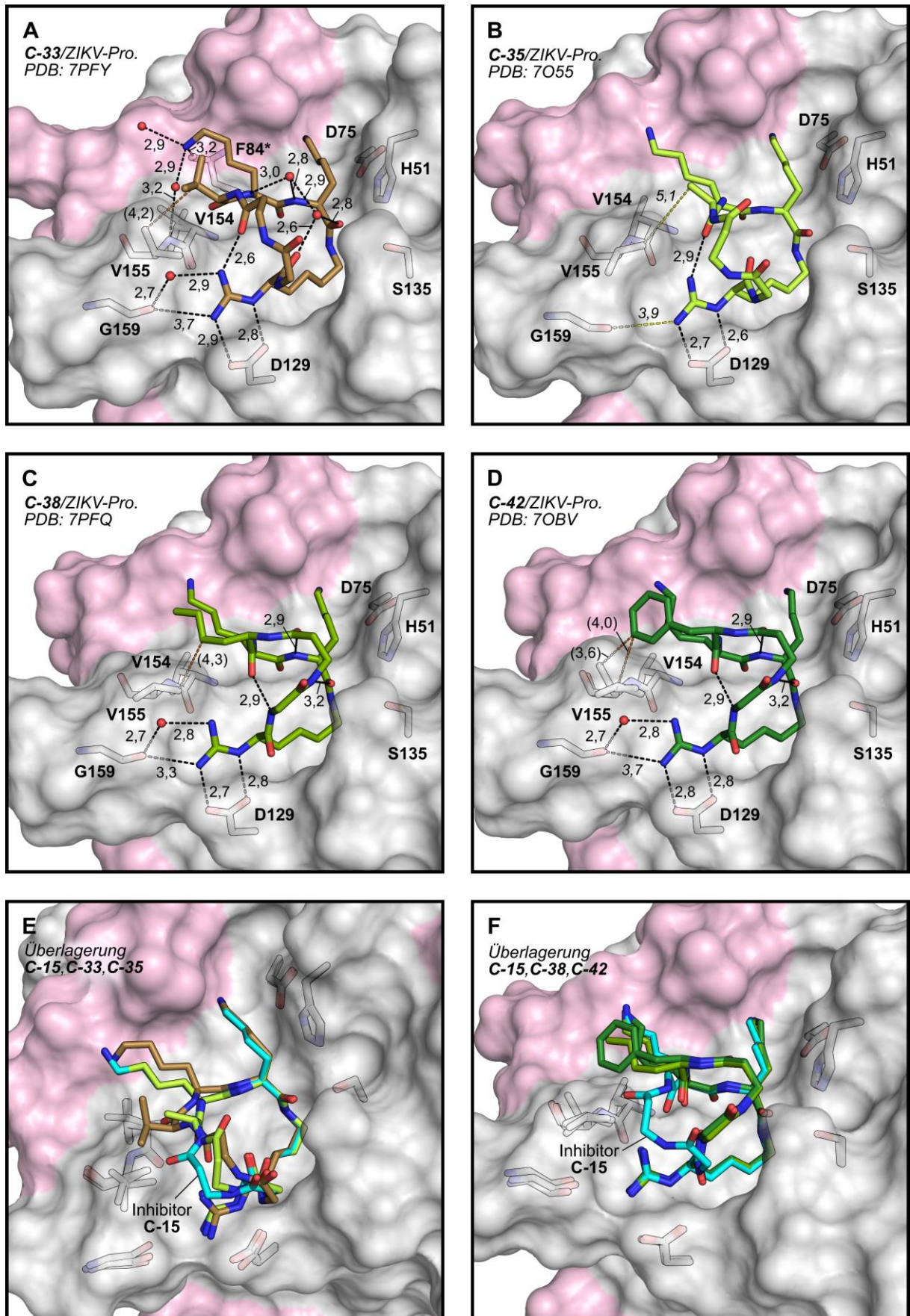
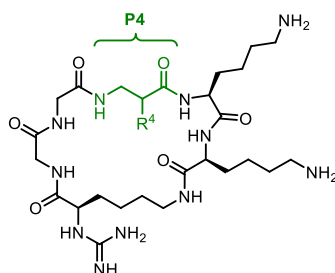


Abbildung 3.11 Beschreibung siehe S.70.

Eine starke Abweichung von der Konformation des Inhibitors **C-15** und der der Leitstruktur **42** wurde für das D-Norleucin-Derivat **C-38** (Abb. 3.11C) und das D-Phenylalanin-Derivat **C-42** (Abb. 3.11D) gefunden. Diese neue Konformation soll hier und im Folgenden als gefaltete Konformation bezeichnet werden. Anders als in den meisten vorangegangenen Komplexstrukturen beobachtet, liegt das Linkersegment nicht bogenförmig über dem P1-Guanidin, sondern oberhalb des Rückgrats des P3-P1-Segments. Wegen veränderter Abstände und Winkel ist bei dieser Inhibitorkonformation keine polare Wechselwirkung zwischen dem P4-Carbonylsauerstoff und dem P1-Guanidin vorhanden. Die wasservermittelte Stabilisierung des Inhibitorrückgrats, wie sie beispielsweise beim Inhibitor **C-33** auftritt (Abb. 3.11A), fehlt. Dass die Inhibitoren **C-38** und **C-42** dennoch eine hohe Affinität zur ZIKV-Protease zeigen, ist durch das Vorhandensein neuer Wechselwirkungen erklärbar. Beide Inhibitoren sind in ihrer gebundenen Form durch jeweils drei intramolekulare Wasserstoffbrücken stabilisiert: Zwischen dem P ω -NH und dem P4-Carbonylsauerstoff, zwischen dem P5-NH und dem P2-Carbonylsauerstoff sowie zwischen dem amidischen P2-NH und dem P5-Carbonylsauerstoff. Diese Wasserstoffbrücken sind bei beiden Inhibitoren gleich lang; insgesamt liegen die Rückgrate beider Inhibitoren in nahezu identischer Konformation vor, wie die Überlagerung in Abbildung 3.11F zeigt.

Das Ziel, mit der P4-Seitenkette der modifizierten Inhibitoren V155 zu adressieren, wurde erreicht. Es ist davon auszugehen, dass eine effektive Van-der-Waals-Wechselwirkung zwischen P4-Seitenkette und V155 nur bei gefalteter Konformation des Inhibitors möglich ist. Dass das D-Phenylalanin-Derivat **C-42** eine etwas höhere Affinität zur ZIKV-Protease als das D-Norleucin-Derivat **C-38** zeigt, ist vermutlich eine Folge der niedrigeren Flexibilität der P4-Seitenkette bei **C-42** und einer effektiveren Wechselwirkung mit V155 (Abb. 3.11C und D). Eine Konformation des Inhibitorrückgrats, die der gefalteten sehr ähnelt, wurde bereits beim Inhibitor **C-25** (vgl. Abb. 3.10, S.67), der wie **C-42** D-Phenylalanin als P4-Rest enthält, aber ein längeres Linkersegment besitzt, gefunden. Die Erkenntnisse aus den Strukturen von **C-38** und **C-42** beachtend ist davon auszugehen, dass beim Inhibitor **C-25** die P4-Seitenkette und nicht die Verlängerung des Linkersegments um eine Aminosäure die ungewöhnliche Konformation induziert.

Ausgehend vom Inhibitor **C-14** (P5-Gly, P4- β -Ala) wurden zwei Derivate hergestellt (Tab. 3.10): Bei den Verbindungen **C-44** und **C-45** wurden D- bzw. L- β^2 -Homophenylalanin als P4-Rest eingebaut (bei dieser Aminosäure entsprechen D- und (S)- bzw. L- und (R)-Konfiguration einander). Für beide Inhibitoren wurden deutlich höhere K_i -Werte als für die Ausgangsverbindung **C-14** bestimmt. Bemerkenswerterweise ist der Affinitätsunterschied zwischen **C-44** und seinem L-Analogen **C-45** deutlich geringer als bei anderen P4-Diastereomerenpaaren (vgl. Tab. 3.7, S.66; Tab. 3.8, S.67; Tab. 3.9, S.68). Die WNV-Protease zeigt, anders als die ZIKV-Protease, eine Präferenz für das L-Derivat **C-45**.

Tabelle 3.10 P4-modifizierte Derivate des Inhibitors **C-14**.

Nr.	P4	K_i [μM]		HPLC [%B]
		ZIKV-Pro.	WNV-Pro.	
C-14		$0,00172 \pm 0,00003$	$0,0686 \pm 0,0131$	11,9
C-44		$0,0630 \pm 0,0042$	$14,8 \pm 0,09$	19,4
C-45		$0,0860 \pm 0,0103$	$6,49 \pm 0,01$	20,2

Vom Inhibitor **C-44** wurde eine Kristallstruktur im Komplex mit der ZIKV-Protease bestimmt (Abb. 3.12A, S.74). Zur Synthese der Inhibitoren **C-44** und **C-45** wurde der P4-Baustein als Racemat eingesetzt (s. Kapitel 3.9.2, S.128 f.); zwar gelang im Laufe der Synthese die Trennung der diastereomeren Vorläufermoleküle der Inhibitoren **C-44** und **C-45**, die Zuordnung der Konformation des P4-Rests konnte jedoch erst auf Basis der Komplexkristallstruktur von **C-44** erfolgen. Aus dieser Kristallstruktur erschließt sich auch der Grund für die niedrige Hemmwirkung des Derivats **C-44** im Vergleich zur Ausgangsverbindung **C-14**. Induziert durch die Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen der P4-Seitenkette und V155 ist das Rückgrat des Linkersegments des Inhibitors **C-44** im Vergleich zu demjenigen von **C-14** deutlich nach Osten in Richtung der katalytischen Triade verschoben (Abb. 3.12B). Dadurch werden zwei der drei intramolekularen Wechselwirkungen des P1-Guanidins, die beim Inhibitor **C-14** auftreten, nicht mehr ausgebildet (vgl. Abb. 3.9A; S.64). Beim Inhibitor **C-44** liegt dafür zusätzlich eine intramolekulare Wechselwirkung zwischen dem P1-Carbonylsauerstoff und dem P4-NH vor. Demzufolge ist die Konformation des Inhibitors **C-44** weniger stabilisiert als die der Ausgangsverbindung **C-14**. Zwischen dem P1-Guanidin des Inhibitors **C-44** und G159 liegen zwei wasservermittelte Interaktionen vor; eine vergleichbare Interaktion wurde ansonsten nur in der Komplexstruktur des Inhibitors **C-25** beobachtet (vgl. Abb. 3.10, S.67).

Die Van-der-Waals-Kontakte zwischen der P4-Seitenkette und V155 sind in den Komplexstrukturen aller P4-modifizierten Derivate mit ausreichend langer Seitenkette vorhanden. Bei Ausbildung dieser Wechselwirkung kommt es vermutlich zu einer thermodynamisch günstigen Verdrängung von

Wassermolekülen. Die in Abbildung 3.12C dargestellte Überlagerung der Derivate **C-25**, **C-42** und **C-44**, die allesamt eine Benzylgruppe als P4-Seitenkette besitzen, zeigt, dass die Positionierung des P4-Benzylrests kaum variiert. Da die Wechselwirkung mit der Seitenkette von V155 zwangsläufig zu einer Konformationsänderung des Inhibitorrückgrats im Linkersegment führt, resultieren daraus Unterschiede in der Anzahl intramolekularer Wechselwirkungen und unterschiedlich starke Hemmwirkungen.

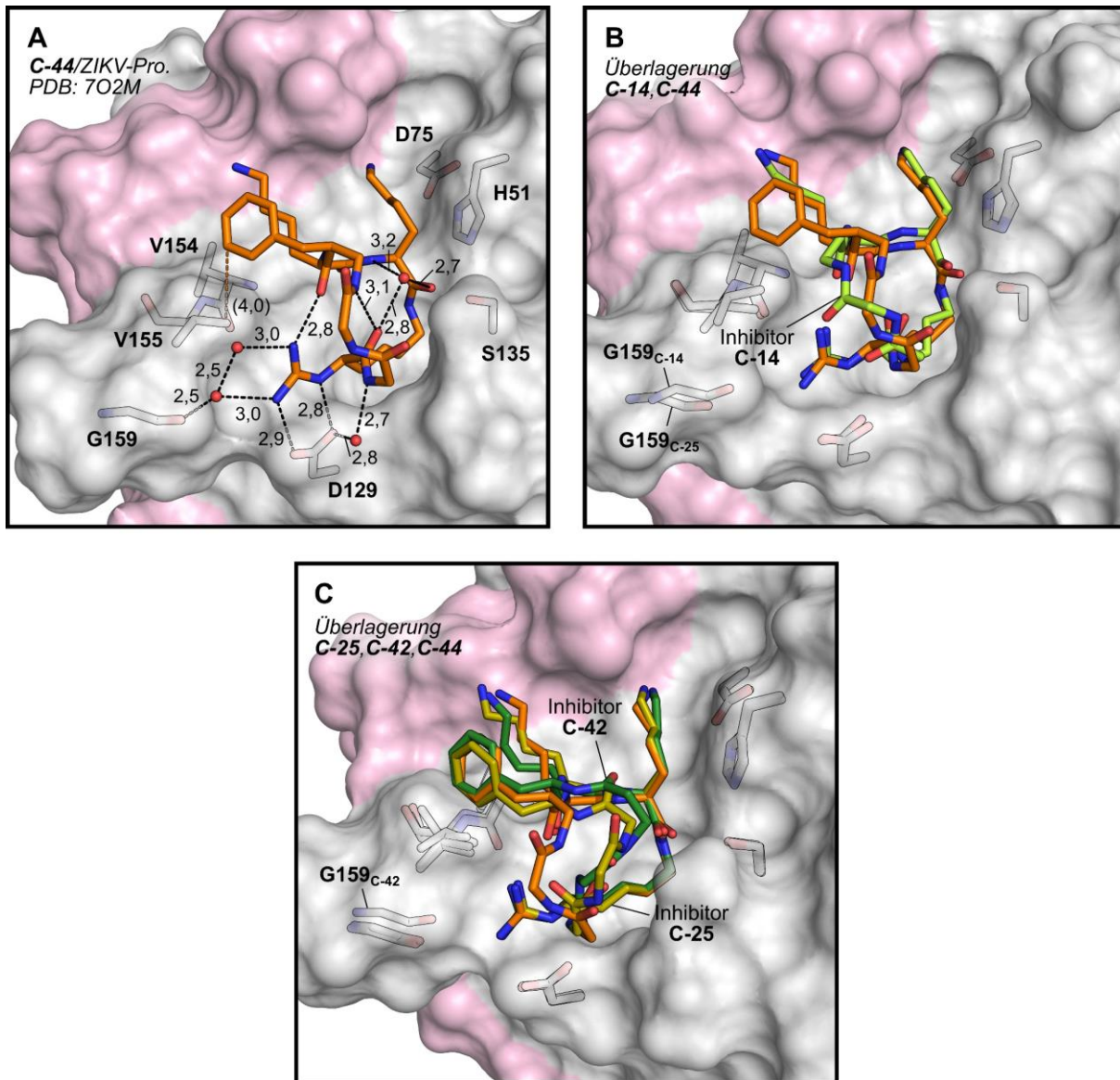
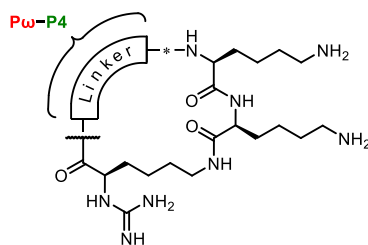


Abbildung 3.12 (A) Kristallstruktur des Inhibitors **C-44** im Komplex mit der ZIKV-Protease, Auflösung: 1,90 Å. (B) Überlagerung der Komplexstrukturen von **C-14** und **C-44**, die Enzymoberfläche entstammt der Struktur des **C-14**/ZIKV-Protease-Komplexes (PDB:7VLH). (C) Überlagerung der Komplexstrukturen der Inhibitoren **C-25**, **C-42** und **C-44**, die Enzymoberfläche entstammt der Struktur des **C-25**/ZIKV-Protease-Komplexes (PDB:7ZWK). Röntgenstrukturanalyse durch S. HUBER (AG STEINMETZER).

3.2.2.3 Linkersegmente ohne P4-Rest

An den Inhibitoren **C-46** bis **C-49** wurde untersucht, inwiefern eine Verknüpfung des P3-Rests mit dem P1-Rest über eine einzelne Aminosäure sinnvoll sei (Tab. 3.11). Getestet wurden der Einbau von ϵ -Aminocaprinsäure, δ -Aminovaleriansäure, γ -Aminobuttersäure und β -Alanin, was Linkersegmenten mit vier bis sieben Rückgratatomen entspricht. In allen vier Fällen wurde im Vergleich zur Leitstruktur **42** (Gly-3-Amphac-Linkersegment mit 11 Rückgratatomen) eine Erhöhung des K_i -Werts um den Faktor 400 bis über 6000 beobachtet. Dabei gibt es keine eindeutige Korrelation zwischen der Länge des Linkersegments und dem K_i -Wert. Wegen der niedrigen Hemmwirkungen der Inhibitoren **C-46** bis **C-49** wurden keine weiteren Derivate mit nur aus einer Aminosäure bestehenden Linkersegmenten hergestellt.

Tabelle 3.11 Inhibitoren mit Linkersegmenten aus einer einzelnen Aminosäure.



Nr.	Pw	P4	K_i [μ M]		HPLC [%B]	
			ZIKV-Pro.	WNV-Pro.		
42	23	Gly	3-Amphac	$0,00168 \pm 0,00036$	$0,149 \pm 0,050$	17,0
47	20	3-Amphac	-	$0,0373 \pm 0,0047$	$15,3 \pm 0,8$	18,0
C-46	20	ϵ -Aca	-	$1,48 \pm 0,20$	$63,3 \pm 7,4$	11,9
C-47	19	δ -Ava	-	$9,24 \pm 2,59$	239 ± 57	12,4
C-48	18	γ -Abu	-	$11,0 \pm 2,5$	116 ± 22	11,9
C-49	17	β -Ala	-	$7,91 \pm 2,00$	$91,8 \pm 20,5$	11,9

3.2.3 P3-Modifikationen

In Tabelle 3.12 (S.77) sind die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten P3-modifizierten Derivate zusammengefasst. Die ersten Aminosäuren, die als Lysin-Ersatz getestet wurden, besitzen ebenfalls eine basische Seitenkette: Die Verbindungen **C-50** und **C-51** wurden zu dem Zweck synthetisiert, die Möglichkeiten zur Entwicklung zellpenetrierender Inhibitoren zu untersuchen (Oligo-Arginin-Segmente sind häufig in zellpenetrierenden Peptiden zu finden). Sowohl für das Norarginin-Derivat **C-50** als auch das Arginin-Derivat **C-51** wurden Hemmwerte in der gleichen Größenordnung wie für die Leitstruktur **42** bestimmt, was eine zu YOSHIDA analoge Entwicklung zellpenetrierender Peptide grundsätzlich erlauben sollte.¹⁶⁵ Obwohl auch die Aminomethylphenylalanin-Derivate **C-52** und **C-53** einen basischen P3-Rest besitzen, wurden für diese niedrigere Hemmwirkungen beobachtet.

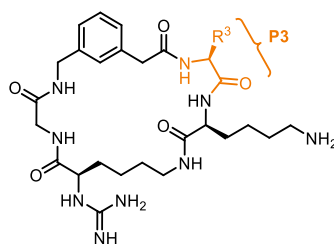
Es wurde bereits mehrfach diskutiert, dass der hydrophile Charakter peptidischer Verbindungen zu einer geringen Membranpermeabilität führt. Bei den bisher vorgestellten Verbindungen (**C-1** bis **C-49**) führt der basische Charakter des P3-, des P2-, und des P1-Rests bei physiologischem pH zu einer dreifachen Protonierung. Für solche dreifach positiv geladenen Peptide ist von einer deutlich reduzierten Membranpermeabilität im Vergleich zu ungeladenen Peptiden auszugehen. In einigen Arbeiten zu multibasischen Inhibitoren des Flavivirins wurde die geringe Membranpermeabilität experimentell belegt.^{142-143,156,164} Daher wurden weitere Derivate der Leitstruktur **42** (**C-54** bis **C-69**) mit nicht-basischen P3-Resten hergestellt, um den basischen Charakter zu reduzieren und die Lipophilie zu erhöhen.

Glutamin wurde im Inhibitor **C-54** als P3-Rest eingebaut, da es als P3-Rest an der natürlichen Flavivirin-Schnittstelle zwischen NS4A und der 2K-Domäne vorkommt.²⁰⁹ Außerdem wurden Citrullin als neutrales Arginin-Mimetikum (**C-55**) und ϵ -Hydroxy-Norleucin als neutrales Lysin-Mimetikum (**C-56**) getestet. Die Hemmwirkung dieser drei Verbindungen auf beide Proteasen entspricht in etwa der Hemmwirkung des 3-Aminomethylphenylalanin-Derivats **C-52**. Als nächstes wurde eine Reihe von Phenylalanin-Derivaten mit polaren Substituenten am Aromaten hergestellt (**C-57** bis **C-61**). Im Vergleich zu den Inhibitoren mit polarer, nicht-aromatischer P3-Seitenkette (**C-54** bis **C-56**) zeigen jene eine niedrigere Hemmwirkung. Für die Inhibitoren **C-62** (Trp), **C-63** (Phe) und **C-65** (2-Nal) mit unsubstituierten aromatischen Seitenketten wurde interessanterweise eine ähnlich effektive Hemmung wie für **C-54** bis **C-56** bestimmt. Beim 2-Naphthylalanin-Derivat **C-65** gilt dies allerdings nur für die Hemmung der ZIKV-Protease, bei der Messung mit der WNV-Protease wurde ein vergleichsweise hoher K_i -Wert von 5,09 μM ermittelt. Dies ist vermutlich auf den großen sterischen Anspruch des Naphthylalanins in Kombination mit dem vergleichsweise engen aktiven Zentrum der WNV-Protease zurückzuführen (vgl. Kapitel 1.2.2.1, S.28). Zuletzt wurden die Inhibitoren **C-67** bis **C-69** mit aliphatischer P3-Seitenkette hergestellt. Es ist festzuhalten, dass bei Einbau nicht-basischer Aminosäuren als P3-Rest die Affinität zur ZIKV-Protease im Vergleich zur Leitstruktur **42** um wenigstens den Faktor 20 fällt, zur WNV-Protease wenigstens um den Faktor 4,5. Absolut betrachtet hemmen jedoch viele dieser Verbindungen die ZIKV-Protease mit K_i -Werten von ca. 40-50 nM und die WNV-Protease mit K_i -Werten von ca. 1 μM . Neben der Abwesenheit der positiven Ladung an der P3-Seitenkette wird bei vielen Verbindungen der lipophile Charakter signifikant erhöht. Beide Faktoren könnten zu einer im Vergleich zum Lysin-Derivat **42** erhöhten Membranpermeabilität beitragen, was eine Substitution am P3-Rest legitimiert.

Von den Inhibitoren **C-50**, **C-56**, **C-58**, **C-62** und **C-65** wurden Kristallstrukturen im Komplex mit der ZIKV-Protease bestimmt (Abb. 3.13, S.79). In den Komplexstrukturen unterscheiden sich nur die Konformation und Positionierung des jeweiligen P3-Rests voneinander, während das Inhibitorrückgrat und die übrigen Seitenketten nahezu identisch wie bei der Leitstruktur **42** positioniert sind (Abb. 3.13A). Es ist darüber hinaus festzustellen, dass die polaren P3-Seitenketten des Norarginin-Derivats **C-50**

(Abb. 3.13B) und des ϵ -Hydroxy-Norleucin-Derivats **C-56** (Abb. 3.13C) ähnlich ausgerichtet sind wie das P3-Lysin der Leitstruktur **42** und eine polare Interaktion mit dem Carbonylsauerstoff des F84* eingehen. Wechselwirkungen mit D83* und S85* wurden in den Komplexstrukturen der Verbindungen **C-50** und **C-56** hingegen nicht beobachtet. Beim ϵ -Hydroxy-Norleucin-Derivat **C-56** liegen des Weiteren eine wasservermittelte Wechselwirkung mit der NH-Gruppe des V155 sowie eine Interaktion mit einem weiteren Wassermolekül vor. Eine ähnliche Ausrichtung der P3-Seitenkette wurde beim linkermodifizierten Inhibitor **C-33** beobachtet (vgl. 3.11A, S.71).

Tabelle 3.12 P3-modifizierte Derivate des Inhibitors **42**. Die Inhibitoren **C-57**, **C-64** und **C-66** wurden von L.C. SCHMACKE synthetisiert und enzymkinetisch charakterisiert.



Nr.	P3	K_i [μ M]		HPLC [%B]
		ZIKV-Pro.	WNV-Pro.	
42	Lys	0,00168 \pm 0,00036	0,149 \pm 0,050	17,0
C-50	nArg	0,00225 \pm 0,00006	0,141 \pm 0,003	16,7
C-51	Arg	0,00334 \pm 0,00071	0,209 \pm 0,019	18,0
C-52	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	0,0454 \pm 0,0163	1,36 \pm 0,46	19,8
C-53	Phe(4-CH ₂ NH ₂)	0,0178 \pm 0,0004	0,964 \pm 0,025	19,4
C-54	Gln	0,0524 \pm 0,0038	0,742 \pm 0,026	17,3
C-55	Cit	0,0525 \pm 0,0031	0,824 \pm 0,061	18,2
C-56	Nle(ϵ -OH)	0,0331 \pm 0,0011	0,905 \pm 0,065	19,2
C-57 ²⁰⁷	Tyr	0,197 \pm 0,008	3,75 \pm 0,12	22,8
C-58	Tyr(3-NH ₂)	0,187 \pm 0,014	2,13 \pm 0,12	18,1
C-59	Tyr(3-NH ₂ , O-C(NH)NH ₂)	0,192 \pm 0,046	4,72 \pm 0,23	23,1
C-60	Phe(3-CN)	0,0725 \pm 0,0194	3,04 \pm 0,01	27,8
C-61	Phe(3-C(O)NH ₂)	0,190 \pm 0,019	5,87 \pm 0,73	22,8
C-62	Trp	0,0344 \pm 0,0022	0,678 \pm 0,058	28,5
C-63	Phe	0,0593 \pm 0,0023	1,53 \pm 0,12	27,5
C-64 ²⁰⁷	hPhe	0,442 \pm 0,012	3,85 \pm 0,30	29,8
C-65	2-Nal	0,0481 \pm 0,0011	5,09 \pm 0,92	33,2
C-66 ²⁰⁷	1-Nal	0,266 \pm 0,011	3,15 \pm 0,26	33,1
C-67	Cha	0,0407 \pm 0,0029	1,61 \pm 0,32	31,8
C-68	Nle	0,0735 \pm 0,0027	1,27 \pm 0,003	25,6
C-69	Ala	0,0469 \pm 0,0063	0,714 \pm 0,033	18,5

Eine veränderte Ausrichtung der P3-Seitenkette wurde bei den Inhibitoren **C-58**, **C-62** und **C-65** mit aromatischem P3-Rest gefunden (Abb. 3.13D-F): Die P3-Seitenkette ist jeweils über V154 und V155 positioniert, vermutlich als Folge des hydrophoben Effekts. Beim 2-Aminotyrosin-Derivat **C-58** (Abb. 3.13D) sind außerdem polare und wasservermittelte Wechselwirkungen ausgehend von der Hydroxy- bzw. der Aminogruppe der P3-Seitenkette vorhanden, die allerdings wegen großer Längen oder ungünstiger Winkel als verhältnismäßig schwach einzustufen sind. An der Komplexstruktur des Tryptophan-Derivats **C-62** (Abb. 3.13E) ist auffällig, dass sich das aromatische System der P3-Seitenkette nicht wie bei den Verbindungen **C-56** und **C-65** flach auf V154 und V155 legt, sondern um 90° nach oben gekippt ist und ins Lösungsmittel ragt. Dennoch wird ein Van-der-Waals-Kontakt zur Seitenkette des V155 ausgebildet. Allein auf Basis der Komplexstrukturen der Inhibitoren **C-58**, **C-62** und **C-65** wäre daher zu erwarten, dass das Tryptophan-Derivat **C-62** am wenigsten affin zur ZIKV-Protease ist. Da **C-62** aber tatsächlich unter den drei Verbindungen der potenteste Inhibitor ist, unterscheiden sich möglicherweise die gebundene Form in Lösung und die im kristallisierten Komplex voneinander. Eine mögliche Ursache der unerwarteten Ausrichtung der P3-Tryptophan-Seitenkette ist die Interaktion mit den C-terminalen Resten der NS2B-Kette, deren Elektronendichte in allen Komplexstrukturen, die in dieser Arbeit vorgestellt werden, fehlt; der letzte sichtbare Rest ist in der Regel V87* oder E88*. In der Struktur eines peptidischen Inhibitors im Komplex mit der WNV-Protease (PDB: 3E90), in der die NS2B-Kette bis zum Rest A93* sichtbar ist, wurde eine Wechselwirkung zwischen D90* und dem P3-Lysin beobachtet.¹⁸⁰ Eine mögliche Wechselwirkung zwischen der Leitstruktur **42** und dem C-terminalen NS2B-Loop wurde bereits diskutiert.¹²²

Im Falle des 2-Naphthylalanin-Derivats **C-65** (Abb. 3.13F) liegt die P3-Seitenkette wie beim 2-Aminotyrosin-Derivat **C-58** über V155. Wegen des größeren aromatischen Systems existieren zusätzliche Van-der-Waals-Kontakte zu den Seitenketten von V154 und L86*, die beim Inhibitor **C-58** nicht vorhanden sind. Eine weitere interessante Beobachtung ist, dass in allen drei Fällen, in denen Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen V155 und der P3-Seitenkette vorliegen (**C-58**, **C-62**, **C-65**), der Abstand zwischen dem 3-Amphac-Rest in P4-Position und V155 länger als bei Inhibitoren mit nicht-aromatischer P3-Seitenkette ist. Bei Letzteren liegt dieser Abstand zwischen 3,9 Å und 4,1 Å. Bei den Inhibitoren **C-58** und **C-65** ist er mit 4,3 Å bzw. 4,5 Å deutlich größer; beim Tryptophan-Derivat **C-62** ist er mit 5,0 Å für einen Van-der-Waals-Kontakt zu groß.

Abbildung 3.13 (S.79) Komplexkristallstrukturen P3-modifizierter Inhibitoren. Wechselwirkungen des P2-Rests und des Inhibitorrückgrats mit dem Enzym sind nicht gezeigt. Längen sind nur für die Wechselwirkungen des P3-Rests mit dem Enzym und für den kürzesten Abstand zwischen V155 und dem P4-Rest angegeben. (A) Inhibitor **42** im Komplex mit der ZIKV-Protease. (B) Inhibitor **C-50** im Komplex mit der ZIKV-Protease. (C) Inhibitor **C-56** im Komplex mit der ZIKV-Protease. (D) Inhibitor **C-58** im Komplex mit der ZIKV-Protease. (E) Inhibitor **C-62** im Komplex mit der ZIKV-Protease. (F) Inhibitor **C-65** im Komplex mit der ZIKV-Protease; die sonst häufig gefundene wasservermittelte Wechselwirkung zwischen dem P1-Guanidin und G159 wurde in dieser Struktur nicht gefunden. Auflösungen: (A) 1,59 Å; (B) 1,38 Å; (C) 1,35 Å; (D) 1,68 Å; (E) 1,52 Å; (F) 1,23 Å. Röntgenstrukturanalyse durch S. HUBER (AG STEINMETZER).

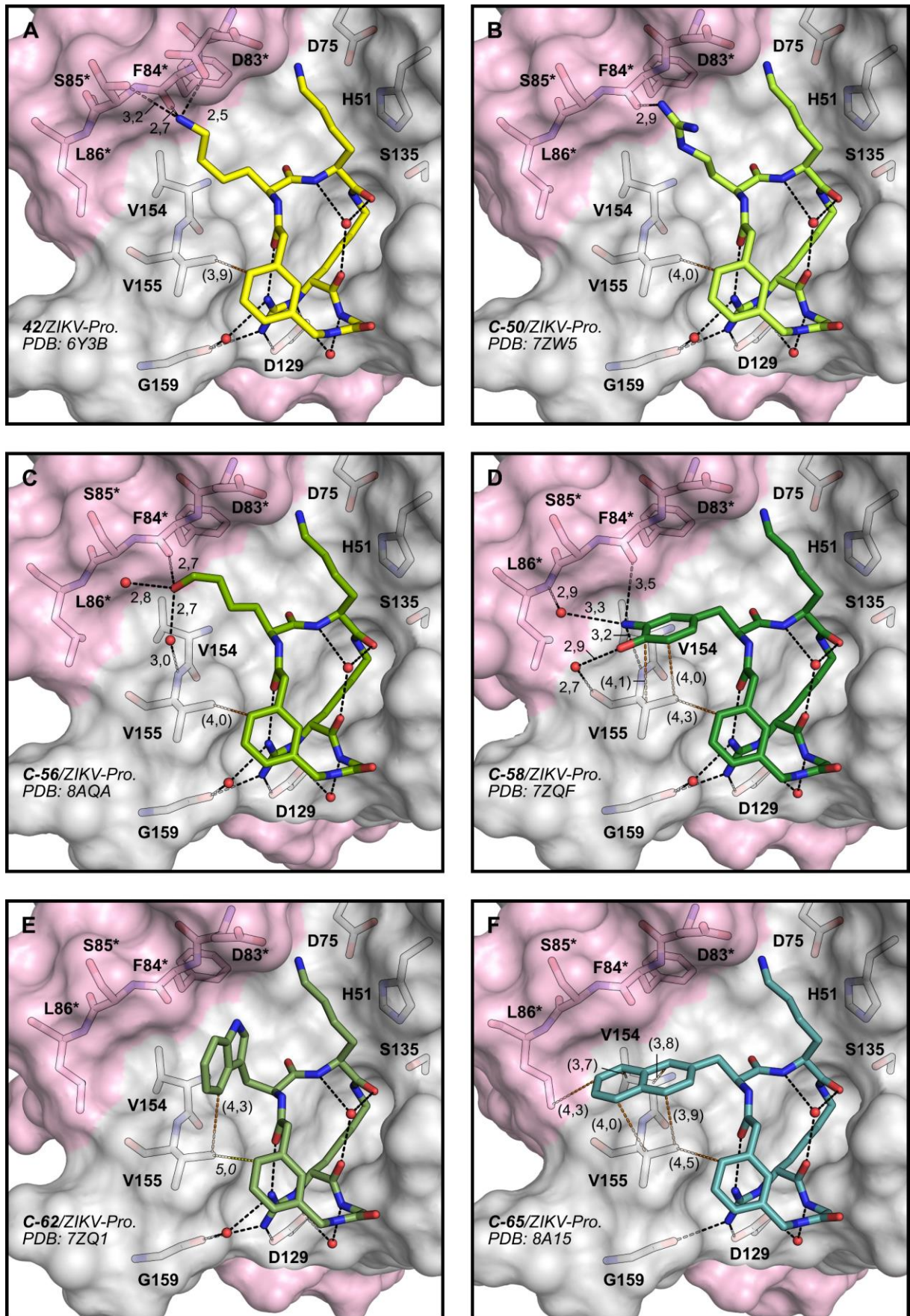


Abbildung 3.13 Beschreibung siehe S.78.

3.2.4 P2-Modifikationen

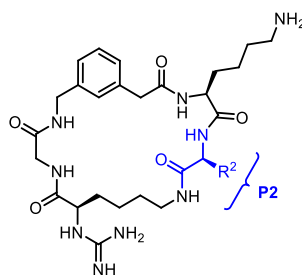
In der Serie P2-modifizierter Derivate der Leitstruktur **42** (Tab. 3.13) wurden die gleichen Aminosäuren eingebaut wie in der P3-modifizierten Serie (vgl. Tab. 3.12, S.77); zusätzlich wurde noch das Derivat **C-70** mit L-2,4-Diaminobuttersäure als P2-Rest hergestellt. Dieses Derivat zeigt eine niedrigere Hemmwirkung als die Leitstruktur **42**. Von ONTORIA *et al.* war bei Austausch des P2-Lysins gegen L-2,4-Diaminobuttersäure eine Affinitätssteigerung um den Faktor 8 beschrieben worden (vgl. Abb. 1.9, S.20, Inhibitoren **9a**, **9c**).

Die Inhibitoren **C-71** bis **C-74** wurden ebenfalls mit basischer P2-Seitenkette hergestellt. Unter diesen zeigte das 3-Aminomethylphenylalanin-Derivat **C-73** eine ähnlich hohe Affinität zur ZIKV-Protease und zur WNV-Protease wie der Referenzinhibitor **42**. Da die Aminogruppe der P2-Seitenkette des Inhibitors **C-73** in benzyllischer Position sitzt, ist der zugehörige K_B -Wert etwa zehnmal so groß wie der der Lysin-Seitenkette. Der Einbau verschiedener Benzylamin-Motive als P1-Baustein mit reduzierter Basizität wurde bereits für Thrombin- und Faktor-Xa-Inhibitoren beschrieben.²¹⁰⁻²¹¹ Auch die Verwendung als Baustein in Flavivirininhibitoren ist bekannt.^{139,155} Mit dem Plasmakallikreininhibitor Berotralstat wurde kürzlich ein Inhibitor mit Benzylamin-Gruppe durch die FDA zugelassen.²¹² Die reduzierte Basizität, die hohe Affinität zur ZIKV- und WNV-Protease und die im Vergleich zur Leitstruktur leicht erhöhte Lipophilie des Inhibitors **C-73** machen 3-Aminomethylphenylalanin zu einer sinnvollen Alternative zum P2-Lysin.

Eine weitere Reduzierung der Basizität gelang durch den Einbau nicht-basischer Aminosäuren (**C-75** bis **C-90**). Bei den Inhibitoren **C-78** bis **C-89** wurde zum Teil auch die Lipophilie stark erhöht. Allerdings wurde bei allen Verbindungen ohne basische P2-Seitenkette ein Affinitätsverlust festgestellt, der deutlich höher ausfiel als bei den entsprechenden P3-Analoga. Die Affinität zur ZIKV-Protease der Inhibitoren ohne basische P2-Seitenkette liegt um den Faktor 400 bis 30.000, die Affinität zur WNV-Protease um den Faktor 180 bis 5.000 niedriger als die der Leitstruktur **42**. Die hohe Empfindlichkeit der P2-Position gegenüber Entfernung der basischen Gruppe wurde bereits in verschiedenen SAR-Studien mit der ZIKV-, der WNV-, der DENV2- und der YFV-Protease für lineare Peptidderivate gezeigt.^{114,135-136,146} Unter den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Derivaten mit nicht-basischer P2-Seitenkette zeigen die Verbindungen mit polarer Seitenkette (**C-75** bis **C-77**), die Tyrosin-Derivate **C-79** und **C-80** sowie das Tryptophan-Derivat **C-83** und das 2-Naphthylalanin-Derivat **C-86** die stärkste Hemmwirkung auf die ZIKV-Protease. Die WNV-Protease wird durch das Glutamin-Derivat **C-75**, den Inhibitor **C-80** mit einem sich vom Tyrosin ableitenden P2-Rest und das Cyclohexylalanin-Derivat **C-88** am effektivsten gehemmt. Unter allen Inhibitoren mit nicht-basischer P2-Seitenkette hemmt nur das Glutamin-Derivat **C-75** die WNV-Protease mit einem K_i -Wert $< 50 \mu\text{M}$.

3.2.4 Einzelmodifikationen der Leitstruktur: P2-Modifikationen

Tabelle 3.13 P2-modifizierte Derivate der Leitstruktur **42**. Der Inhibitor **C-78** wurde von L.C. SCHMACKE synthetisiert und enzymkinetisch charakterisiert.



Nr.	P2	K_i [μM]		HPLC [%B]
		ZIKV-Pro.	WNV-Pro.	
42	Lys	$0,00168 \pm 0,00036$	$0,149 \pm 0,050$	17,0
C-70	Dab	$0,0129 \pm 0,0036$	$0,689 \pm 0,006$	16,4
C-71	nArg	$0,0395 \pm 0,0019$	$0,803 \pm 0,064$	17,1
C-72^a	Arg	$0,0112 \pm 0,0009$	$0,898 \pm 0,114$	17,7
C-73	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	$0,00269 \pm 0,00014$	$0,183 \pm 0,011$	19,0
C-74	Phe(4-CH ₂ NH ₂)	$0,0115 \pm 0,0006$	$0,852 \pm 0,026$	19,0
C-75	Gln	$1,97 \pm 0,08$	$27,6 \pm 3,1$	17,5
C-76	Cit	$2,44 \pm 0,007$	$75,3 \pm 2,1$	17,6
C-77	Nle(ϵ -OH)	$2,64 \pm 0,27$	121 ± 18	19,2
C-78²⁰⁷	Tyr	$18,2 \pm 1,1$	422 ± 70	22,2
C-79	Tyr(3-NH ₂)	$3,71 \pm 0,25$	$77,9 \pm 1,7$	19,0
C-80	Tyr(3-NH ₂ ,O-C(NH)NH ₂)	$0,697 \pm 0,089$	$57,1 \pm 7,2$	22,9
C-81	Phe(3-CN)	$6,92 \pm 0,46$	124 ± 5	26,1
C-82	Phe(3-C(O)NH ₂)	$6,62 \pm 0,67$	135 ± 9	21,8
C-83	Trp	$2,79 \pm 0,18$	$69,5 \pm 1,1$	26,2
C-84	Phe	$8,68 \pm 0,36$	$99,7 \pm 1,6$	25,5
C-85	hPhe	$39,2 \pm 0,6$	> 500	28,8
C-86	2-Nal	$3,06 \pm 0,15$	101 ± 19	30,5
C-87	1-Nal	$20,3 \pm 7,4$	$95,5 \pm 4,0$	30,7
C-88	Cha	$7,83 \pm 0,36$	$50,4 \pm 3,8$	30,5
C-89	Nle	$12,4 \pm 4,3$	$99,1 \pm 4,3$	25,4
C-90	Ala	$52,5 \pm 4,1$	342 ± 25	18,1

^aDENV2-Pro.: $K_i = 2,41 \mu\text{M} \pm 0,33 \mu\text{M}$.

Von vier der P2-modifizierten Inhibitoren (**C-71**, **C-73**, **C-83**, **C-89**) wurden Kristallstrukturen im Komplex mit der ZIKV-Protease bestimmt (Abb. 3.14, S.83). Wie schon bei den P3-Derivaten unterscheiden sich hier die Wechselwirkungen des Inhibitorrückgrats und die Interaktionen in der S1-Tasche nicht wesentlich von denen der Leitstruktur **42** (vgl. Abb. 2.5, S.40; Abb. 3.13, S.79). In der Komplexstruktur des Inhibitors **C-71** (nArg) nimmt die Seitenkette des D83* (wie im Komplex mit dem

Inhibitor **42**) zwei Konformationen ein. Bemerkenswerterweise gibt es bei der Ausrichtung der D83*-Seitenkette in Richtung der S2-Tasche (Besetzung: 42 %) keine polare Wechselwirkung mit dem P2-Norarginin von **C-71**: Der kürzeste Abstand zwischen D83* und dem Norarginin beträgt 4,0 Å. Hingegen liegen die polaren Wechselwirkungen zur Seitenkette des N152 (2,9 Å) und zum Carbonylsauerstoff von G82* (3,5 Å), die in der Regel auch bei Inhibitoren mit Lysin als P2-Rest vorhanden sind, auch hier vor. Eine bisher nicht beobachtete Wechselwirkung ist die über ein Sulfation vermittelte Interaktion zwischen dem P2-Rest und der Seitenkette des K84. Diese Interaktion kann allerdings keinen Einfluss auf die angegebenen Hemmkonstanten genommen haben, da in enzymkinetischen Messungen im Gegensatz zu den Kristallisationsexperimenten immer sulfatfreie Puffer benutzt wurden. Des Weiteren ist die P3-P2-Peptidbindung im Vergleich zu der der Leitstruktur und denen der meisten anderen Inhibitoren leicht verdreht (ca. 20°). Daraus resultiert eine veränderte intramolekulare wasservermittelte Wechselwirkung, die denen der P ω -modifizierten Inhibitoren (vgl. Abb. 3.8, S.60-61) und der des Inhibitors **C-33** (vgl. Abb. 3.11A, S.71) gleicht. Die Kristallstruktur des Inhibitors **C-71** im Komplex mit der ZIKV-Protease ist aktuell die höchstaufgelöste Flavivirin-Struktur in der PDB (Auflösung 1,20 Å).

Die Seitenkette des 3-Aminomethylphenylalanin-Derivats **C-73** bildet Wechselwirkungen zu N152, G82*, D83* und zu einem Wassermolekül aus (Abb. 3.14B); diese Interaktionen gleichen denen des P2-Lysins der Leitstruktur **42**. In der Komplexstruktur des Inhibitors **C-73** nimmt die D83*-Seitenkette nur eine Konformation ein und ist in die S2-Tasche gerichtet. Es ist unklar, warum D83* in der Komplexstruktur des Inhibitors **C-73** nur eine Konformation einnimmt, während es im Komplex mit dem Inhibitor **C-71** bzw. der Leitstruktur **42** in zwei Konformationen vorliegt (alle drei Inhibitoren besitzen mit Lysin den gleichen P3-Rest). Es ist erstaunlich, dass die Seitenkette des P3-Lysins des Inhibitors **C-73** mit ihrer terminalen Aminogruppe ins Lösungsmittel hineinragt und daher keine Wechselwirkung mit der Protease zeigt. Eine plausible Ursache für diese ungewöhnliche Ausrichtung ist die Wechselwirkung mit den C-terminalen Resten der NS2B-Kette, deren Elektronendichte in allen Komplexstrukturen fehlt, was bereits bezüglich der Komplexstruktur des Inhibitors **C-62** diskutiert wurde (vgl. Kap. 3.2.3, S.78). Es ist wahrscheinlich, dass die ungewöhnliche Ausrichtung des P3-Lysins im Kristall die Ausrichtung in Lösung nur bedingt wiedergibt, da die Hemmwirkungen des Inhibitors **C-73** und der Leitstruktur **42** ähnlich hoch sind.

Abbildung 3.14 (S.83) Komplexkristallstrukturen P2-modifizierter Inhibitoren. Wechselwirkungen des Inhibitorrückgrats mit dem Enzym sind nicht gezeigt. Längen sind nur für Wechselwirkungen des P3- und des P2-Rests sowie für intramolekulare wasservermittelte Wechselwirkungen angegeben. (A) Inhibitor **C-71** im Komplex mit der ZIKV-Protease. (B) Inhibitor **C-73** im Komplex mit der ZIKV-Protease. (C) Inhibitor **C-83** im Komplex mit der ZIKV-Protease. (D) P2-Detail-Ansicht aus der Komplexkristallstruktur des Inhibitors **C-83**. (E) Inhibitor **C-89** im Komplex mit der ZIKV-Protease. (F) Zweite Konformation des Inhibitors **C-89** im Komplex mit der ZIKV-Protease. Auflösungen: (A) 1,20 Å; (B) 1,40 Å; (C) 1,27 Å; (E) bzw. (F) 1,26 Å. Röntgenstrukturanalyse durch S. HUBER (AG STEINMETZER).

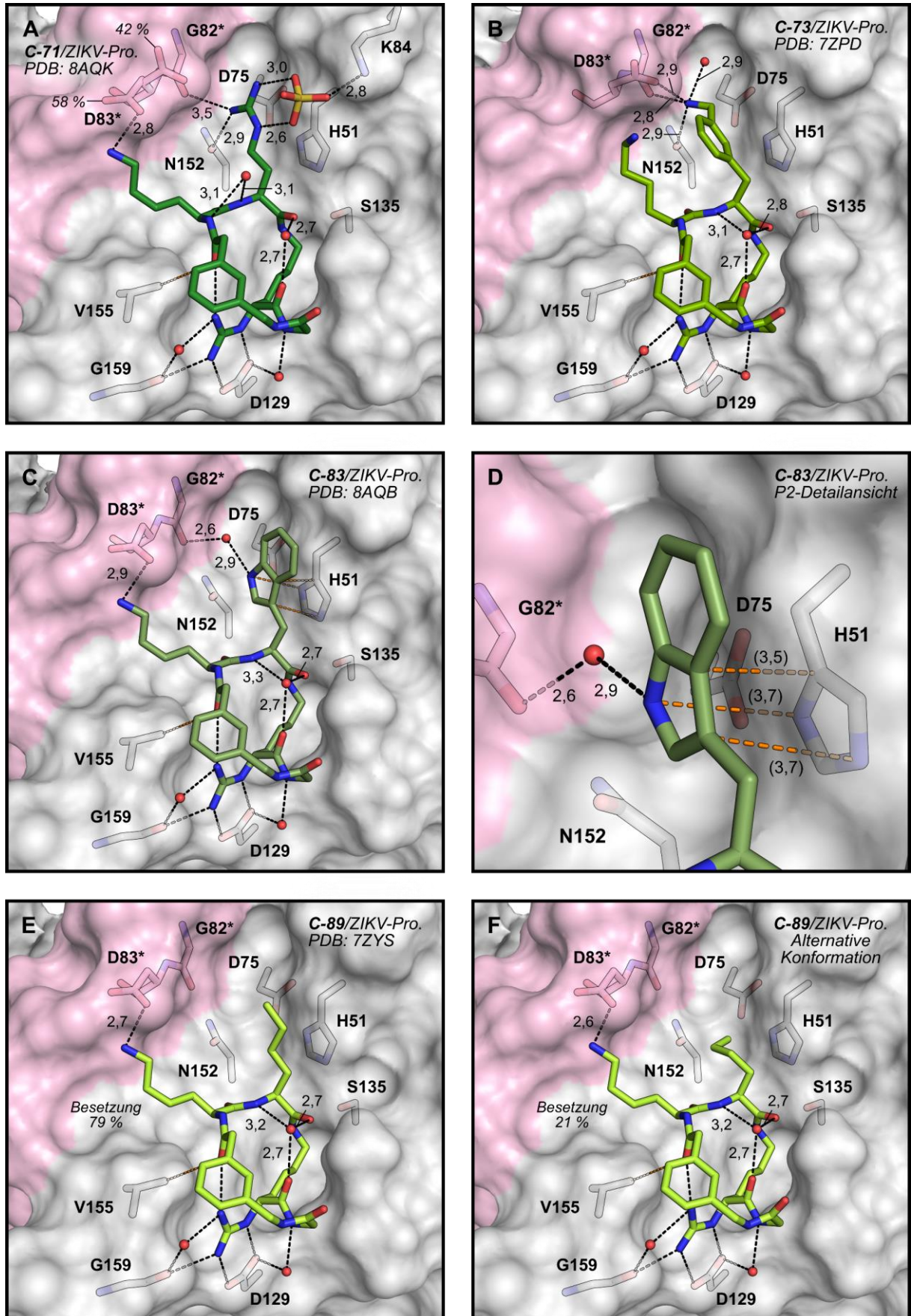


Abbildung 3.14 Beschreibung siehe S.82.

Beim Tryptophan-Derivat **C-83** und beim Norleucin-Derivat **C-89** ist die Seitenkette des D83* erwartungsgemäß zum P3-Lysin hin ausgerichtet (Abb. 3.14C-F). Wegen des unpolaren Charakters der jeweiligen Seitenkette geht keiner der beiden Inhibitoren direkte polare Wechselwirkungen in der S2-Tasche ein; beim Inhibitor **C-83** liegt lediglich eine wasservermittelte Wechselwirkung zwischen dem indolischen NH und dem Carbonylsauerstoff des G82* vor (Abb. 3.14C). Allerdings bestehen π - π -Wechselwirkungen zwischen dem Indolsystem der Tryptophanseitenkette von **C-83** und dem Imidazol des H51 (Abb. 3.14D). Die π - π -Wechselwirkungen tragen vermutlich dazu bei, dass die ZIKV-Protease durch den Inhibitor **C-83** effektiver gehemmt wird als durch das Norleucin-Derivat **C-89**. Beim Inhibitor **C-89** sind in der S2-Tasche keine polaren Wechselwirkungen möglich. Dadurch ist die Flexibilität der Norleucin-Seitenkette vergleichsweise hoch, was sich in der Beobachtung zweier Konformationen äußert (Abb. 3.14E und F).

3.2.5 P1-Modifikationen

Das P1-Guanidin ist die funktionelle Gruppe der Leitstruktur **42** mit der höchsten Basizität. Da eine hohe Basizität im Allgemeinen zu einer niedrigeren Membranpermeabilität führt, könnte die Identifizierung eines weniger basischen P1-Rests die Permeabilität der Inhibitoren und damit die Hemmwirkung auf das intrazellulär lokalisierte Flavivirin verbessern. Allerdings geht das P1-Guanidin zahlreiche inter- und intramolekulare Wechselwirkungen ein (vgl. Abb. 2.5, S.40), sodass bei dessen Austausch mit einem Affinitätsverlust zu rechnen ist.

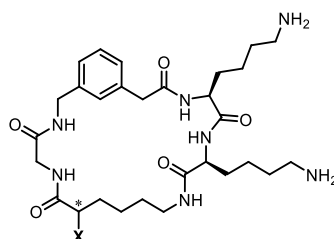
Zunächst sollte jedoch nochmals die P1-Stereopräferenz überprüft werden, da aus der ursprünglichen Serie der Inhibitoren **38** bis **44** (γ -Abu-4-Amphac als Linker; vgl. Tab. 3.1, S.45) keine eindeutige Stereopräferenz ableitbar ist. Dazu wurde der Inhibitor **C-91** mit einem L-konfigurierten P1-Rest, also das L-Analogon der Leitstruktur **42**, als Referenzverbindung synthetisiert (Tab. 3.14). Tatsächlich ist der Inhibitor **C-91** um einen Faktor 25 weniger affin zur ZIKV-Protease und um einen Faktor 65 weniger affin zur WNV-Protease als die Leitstruktur **42**. Die Konfiguration des P1-Rests beeinflusst hier die Affinität zum Flavivirin also deutlich (vgl. Tab. 3.1, S.45).

Des Weiteren wurden mit den Inhibitoren **C-92** und **C-93** zwei Verbindungen mit veränderter P1-Funktionalität synthetisiert. Beim Inhibitor **C-92**, der anstelle der Guanidinogruppe eine Aminogruppe enthält, wurde eine stark verringerte Hemmwirkung sowohl auf die ZIKV- (Faktor 13.500) als auch auf die WNV-Protease (Faktor 650) beobachtet. Auch beim Inhibitor **C-93**, der eine Harnstoffgruppe als P1-Funktionalität enthält, wurde ein starker Affinitätsverlust zu beiden Proteasen beobachtet, der jedoch weniger hoch ausfiel als beim Amin-Derivat **C-92**. Beim Harnstoff-Derivat **C-93** ist im Gegensatz zu **C-92** mit einer Wechselwirkung zum G159 und einer intramolekularen Wechselwirkung zum P4-Carbonylsauerstoff zu rechnen. Anders als bei der Leitstruktur **42** sind diese Interaktionen jedoch nicht ladungsunterstützt, wodurch sich der starke Affinitätsverlust verstehen lässt.

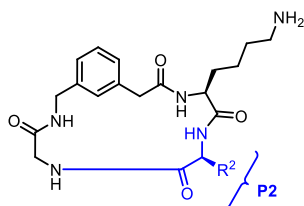
Starke Affinitätsverluste bei Entfernung der positiven Ladung der P1-Seitenkette sind für aldehydische Inhibitoren der DENV2-, WNV- und YFV-Protease bekannt.^{114,135-136}

Außer der Veränderung der P1-Funktionalität wurde untersucht, ob eine direkte Verknüpfung des P ω -Rests mit dem P2-Rest möglich sei (Tab. 3.15, S.86). Bei einer solchen Verknüpfung ändert sich die Positionierung der Reste möglicherweise derart, dass der P ω -Rest bzw. der P2-Rest nicht mehr als solche bezeichnet werden können. Da jedoch mangels einer Kristallstruktur solcher Derivate „ohne P1-Rest“ der Bindungsmodus zwischen Enzym und Inhibitor unbekannt ist, sollen die Reste auch hier in der bisher verwendeten Weise benannt werden. Bei den Derivaten „ohne P1-Rest“ wurde lediglich die P2-Position variiert: Bei den Inhibitoren **C-94** bis **C-97** wurden basische Gruppe verschiedener Länge verwendet, da diese Inhibitoren eventuell derart ins aktive Zentrum binden, dass der P3-Rest in die S2-Tasche und der P2-Rest in die S1-Tasche bindet. Für alle vier Derivate wurden hohe Hemmkonstanten von $> 25 \mu\text{M}$ mit der ZIKV-Protease und $> 500 \mu\text{M}$ mit der WNV-Protease bestimmt. Für das Tryptophan-Derivat **C-98** wurde mit einem K_i -Wert von $231 \mu\text{M}$ die niedrigste Hemmwirkung auf die ZIKV-Protease aller in dieser Arbeit vorgestellten Inhibitoren bestimmt. Der Einbau des Tryptophans wurde getestet, weil in einer Serie von WNV-Proteaseinhibitoren Tryptophanaldehyd als ein akzeptabler Ersatz für Arginal in P1-Position beschrieben wurde.¹¹⁴ Jedoch konnte für keines der in Tabelle 3.15 gezeigten Derivate bei den eingesetzten Konzentrationen eine messbare Hemmwirkung auf die WNV-Protease festgestellt werden.

Tabelle 3.14 Derivate des Inhibitors **42** mit variiertem P1-Funktionalität.



Nr.	X	*	K_i [μM]		HPLC [%B]
			ZIKV-Pro.	WNV-Pro.	
42		(R)	$0,00168 \pm 0,00036$	$0,149 \pm 0,050$	17,0
C-91		(S)	$0,0450 \pm 0,0032$	$9,98 \pm 0,40$	16,9
C-92		(R)	$22,6 \pm 1,0$	$98,9 \pm 19,0$	15,9
C-93		(R)	$11,7 \pm 1,2$	$67,7 \pm 5,3$	16,7

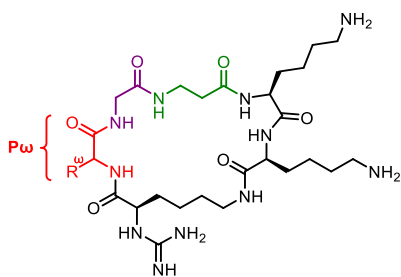
Tabelle 3.15 Inhibitoren ohne guanlyliertes D-Lysin als P1-Rest

Nr.	P2	K _i [μM]		HPLC [%B]
		ZIKV-Pro.	WNV-Pro.	
C-94	Lys	29,2 ± 4,7	> 500	17,4
C-95	hArg	56,9 ± 2,9	> 500	18,8
C-96	Orn	35,5 ± 2,5	> 500	17,1
C-97	nArg	34,1 ± 3,5	> 500	18,1
C-98	Trp	231 ± 57	> 500	28,3

3.3 Kombinierte Derivate

3.3.1 P_ω-modifizierte Derivate des Inhibitors C-14

Ein P4-modifiziertes Derivat der Leitstruktur **42** ist der Inhibitor **C-14**. Dieser zeigte eine gleich starke Hemmwirkung auf die ZIKV- und die DENV4-Protease wie die Leitstruktur selbst, die Hemmwirkung auf die WNV-Protease ist um einen Faktor 2 höher. Daher wurden einige Derivate dieses Inhibitors mit modifiziertem P_ω-Rest hergestellt (Tab. 3.16). Getestet wurden D-Cyclohexylalanin (**C-99**), D-Homocyclohexylalanin (**C-100**) und D-Homophenylalanin (**C-101**).

Tabelle 3.16 Derivate des Inhibitors C-14 mit modifiziertem P_ω-Rest.

Nr.	P _ω	K _i [μM]		HPLC [%B]
		ZIKV-Pro.	WNV-Pro.	
C-14	Gly	0,00172 ± 0,00003	0,0686 ± 0,0131	11,9
C-99	D-Cha	0,103 ± 0,002	2,04 ± 0,15	24,8
C-100	D-hCha	0,0366 ± 0,004	0,767 ± 0,050	29,7
C-101	D-hPhe	0,0850 ± 0,0056	1,81 ± 0,12	22,0

In allen drei Fällen führte die Modifizierung jeweils zu einer Verringerung der Hemmwirkung um den Faktor 10 bis 60. Bei den entsprechenden P ω -modifizierten Derivaten der Leitstruktur **42** wurde lediglich ein Affinitätsverlust um den Faktor 1,5 bis 3,5 festgestellt (vgl. Tab. 3.5, S.57). In den Komplexkristallstrukturen der Derivate der Leitstruktur **42** mit D-Cyclohexylalanin (**C-7**) bzw. D-Homocyclohexylalanin (**C-8**) als P ω -Rest war eine signifikante Verschiebung des P ω -Rückgrats beobachtet worden (vgl. Abb. 3.8, S.60-61). Unter der Voraussetzung, dass der Einbau sterisch anspruchsvoller Aminosäuren in die P ω -Position bei den Inhibitoren **C-99** bis **C-101** ebenfalls zu einer Änderung der Linkerkonformation führt, ist die vergleichsweise hohe Affinitätsverlust dieser Derivate erklärbar. In der Komplexkristallstruktur des Inhibitors **C-14** ist dessen Linkersegment ideal positioniert, um die Inhibitorkonformation über intramolekulare Wechselwirkungen zu stabilisieren (vgl. Abb. 3.9A, S.64). Die Einnahme einer veränderten Konformation, die bei **C-99** bis **C-101** auftreten könnte, würde zu weniger günstigen intramolekularen Wechselwirkungen und damit zu höheren K_i-Werten führen. Interessanterweise ist unter den drei Derivaten aus Tabelle 3.16 die Verbindung **C-100** mit D-Homocyclohexylalanin der effektivste Inhibitor. Unter den P ω -modifizierten Derivaten der Leitstruktur **42** war ebenfalls das D-Homocyclohexylalanin-Derivat **C-8** der effektivste Inhibitor.

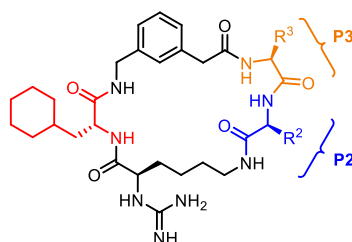
3.3.2 Lipophile Kombinationen

Eines der Ziele dieser Arbeit war es, Modifizierungsmöglichkeiten auszumachen, die die Synthese von im Vergleich zur Leitstruktur **42** lipophileren und idealerweise weniger basischen Inhibitoren ermöglichen. Die Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehung einzelmodifizierter Derivate der Leitstruktur **42** lieferte bezüglich des Einbaus hydrophober Aminosäuren folgende Erkenntnisse:

1. Ein Austausch des P1-Rests ist nicht sinnvoll.
2. P2-Position: Der Einbau nicht-basischer Reste führt immer zu einem starken Affinitätsverlust. Als sinnvolles Lysin-Mimetikum mit reduzierter Basizität wurde 3-Aminomethylphenylalanin identifiziert.
3. P3-Position: Der Einbau hydrophober L-Aminosäuren anstelle des Lysins ist möglich, geht in aller Regel jedoch mit einem Affinitätsverlust zur ZIKV-Protease um den Faktor 20-40 und einem Affinitätsverlust um den Faktor 5-10 zur WNV-Protease einher.
4. P4-Position: Der Austausch des 3-Amphac gegen ein Segment der allgemeinen Struktur β -Ala-D-Xaa, wobei D-Xaa für eine hydrophobe D-Aminosäure steht, ist nahezu ohne Affinitätsverlust möglich.
5. P ω -Position: Der Austausch des Glycins gegen hydrophobe D-Aminosäuren ist nahezu ohne Affinitätsverlust möglich.

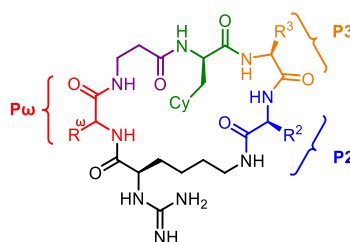
Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse wurden zwei Serien kombinierter, lipophiler Inhibitoren hergestellt (Tab. 3.17; Tab. 3.18). Die in Tabelle 3.17 gezeigte Serie wurde ausgehend vom P ω -modifizierten Inhibitor **C-7** entwickelt (vgl. Tab. 3.5, S.57). In P3-Position wurden dabei verschiedene aromatische Reste getestet, in P2-Position außer Lysin auch 3-Aminomethylphenylalanin und 3-Carbamoylphenylalanin. Die in Tabelle 3.18 gezeigten Derivate wurden ausgehend vom Inhibitor **C-39**, dem lipophilsten Inhibitor mit Gly- β -Ala-D-Xaa als Linkersegment, entwickelt (vgl. Tab. 3.9, S.68). Mit Ausnahme des Inhibitors **C-109** hemmen die Inhibitoren **C-102** bis **C-113** die ZIKV-Protease mit K_i -Werten $< 1 \mu\text{M}$; die Inhibitoren **C-105**, **C-106** und **C-110** bis **C-113** hemmen auch die WNV-Protease mit K_i -Werten $< 1 \mu\text{M}$. Diese Hemmwerte und die im Vergleich zur Leitstruktur **42** (HPLC: 17,0 % B) deutlich höhere Lipophilie machen einige der kombinierten Derivate zu vielversprechenden Kandidaten für weitere Untersuchungen.

Tabelle 3.17 Derivate des Inhibitors **C-7** mit modifizierten P3- und P2-Resten. Die Inhibitoren **C-102** bis **C-104** wurden von L.C. SCHMACKE synthetisiert und enzymkinetisch charakterisiert.²⁰⁷



Nr.	P3	P2	K_i [μM]		HPLC [%B]
			ZIKV-Pro.	WNV-Pro.	
C-7	Lys	Lys	$0,00359 \pm 0,00034$	$0,395 \pm 0,032$	30,1
C-102 ²⁰⁷	Trp	Lys	$0,299 \pm 0,002$	$2,97 \pm 0,17$	39,5
C-103 ²⁰⁷	2-Nal	Lys	$0,148 \pm 0,007$	$8,96 \pm 1,41$	43,2
C-104 ^{a,207}	N-Me-2-Nal	Lys	$0,435 \pm 0,019$	$7,94 \pm 0,86$	44,6
C-105	Lys	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	$0,0141 \pm 0,0001$	$0,519 \pm 0,017$	31,3
C-106	Phe(4-CH ₂ NH ₂)	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	$0,0339 \pm 0,0053$	$0,907 \pm 0,105$	33,0
C-107	Phe	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	$0,254 \pm 0,012$	$2,23 \pm 0,08$	41,6
C-108	2-Nal	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	$0,259 \pm 0,020$	$1,78 \pm 0,15$	46,2
C-109	Trp	Phe(3-C(O)NH ₂)	$25,8 \pm 0,4^b$ ($p = 4,00 \pm 0,14$) ^c	$45,5 \pm 1,9^b$ ($p = 2,54 \pm 0,07$) ^c	49,3

^aDas P3-Amid dieses Inhibitors ist methyliert; ^b IC_{50} -Wert; ^cHill-Koeffizient.

Tabelle 3.18 Derivate des Inhibitors **C-39** mit modifizierten P ω -, P3- und P2-Resten.

Nr.	P ω	P3	P2	K _i [μM]		HPLC [%B]
				ZIKV-Pro.	WNV-Pro.	
C-39	Gly	Lys	Lys	0,00694 ± 0,00058	0,735 ± 0,054	24,2
C-110	D-Cha	Lys	Lys	0,00428 ± 0,00023	0,993 ± 0,40	36,1
C-111	D-hCha	Lys	Lys	0,00637 ± 0,00065	0,843 ± 0,076	38,9
C-112	D-hPhe	Lys	Lys	0,0125 ± 0,0005	0,983 ± 0,025	34,8
C-113	D-Cha	Lys	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	0,145 ± 0,003	0,803 ± 0,072	37,8
C-114	D-Cha	Lys	Phe(3-C(O)NH ₂)	27,3 ± 0,3 ^a (p = 3,31 ± 0,12) ^b	82,5 ± 2,7 ^a (p = 2,95 ± 0,13) ^b	40,1
C-115	D-Cha	Phe	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	0,245 ± 0,004	6,22 ± 0,19	48,3
C-116	D-Cha	Phe	Phe(3-C(O)NH ₂)	2,14 ± 0,09 ^a (p = 2,64 ± 0,18) ^b	1,48 ± 0,16 ^a (p = 2,20 ± 0,41) ^b	58,3

^aIC₅₀-Wert; ^bHill-Koeffizient.

Bei der enzymkinetischen Charakterisierung der vergleichsweise hydrophoben Inhibitoren **C-109**, **C-114** und **C-116** mit der ZIKV- und der WNV-Protease wurde erstmals in dieser Arbeit eine Abweichung vom reversibel-kompetitiven Hemmmodus festgestellt. Eine Beschreibung der Dosis-Wirkungs-Kurve ist mit der Gleichung für kompetitives Hemmverhalten (2, S.49) bei diesen Inhibitoren nicht möglich, weshalb hier nur IC₅₀-Werte angegeben sind. Bei den Inhibitoren **C-109**, **C-114** und **C-116** mit Carbamoylphenylalanin als P2-Rest wurde bei der Messung mit der ZIKV-Protease innerhalb von 600 s ein nicht-linearer Verlauf der Umsatzkurven beobachtet (bei den zuvor beschriebenen Inhibitoren wurden innerhalb von 600 s immer lineare Umsatzkurven erhalten). Daher wurde die Messung von den sonst üblichen 600 s auf 1800 s verlängert. Aus den Umsatzkurven wurden dann zwei verschiedene IC₅₀-Werte berechnet: Ein „initialer“ Wert, für dessen Berechnung nur die Messpunkte aus dem Zeitintervall von 0 s bis 300 s berücksichtigt wurden und ein „finaler“ Wert, bei dem nur die Messpunkte aus dem Zeitintervall von 1500 s bis 1800 s berücksichtigt wurden (Abb. 3.15, S.91; Tab. 3.19, S.90). Die als Dixon-Plot bekannte Auftragung von 1/v gegen die Inhibitor-konzentration verdeutlicht die Abweichung vom kompetitiven Hemmmodus (Abb. 3.16, S.92): Bei einer normalen kompetitiven Hemmung zeigt die Auftragung der reziproken Geschwindigkeiten als Funktion der Inhibitor-konzentration einen linearen Verlauf wie beim Inhibitor **C-115** (Abb. 3.16C; vgl. auch

Abb. 3.4E, S.51; Abb. 3.5E, S.52). Bei den Inhibitoren **C-109**, **C-114** und **C-116** weichen die $1/v$ -Werte ab einer kritischen Konzentration vom linearen Verlauf ab und zeigen insgesamt einen parabolischen Verlauf. Dies gilt gleichermaßen für die Auftragung der initialen und der finalen $1/v$ -Werte; der parabolische Verlauf ist bei den finalen Werten stärker ausgeprägt als bei den initialen Werten; mit zunehmender Messdauer wird die Abweichung vom kompetitiven Hemmmechanismus also stärker. Da bei allen drei Inhibitoren der initiale und der finale IC_{50} -Wert jeweils in der gleichen Größenordnung liegen und sich maximal um einen Faktor 2 unterscheiden, wird sich fortan zu Vergleichszwecken auf den initialen IC_{50} -Wert bezogen. Bei den in den Tabellen 3.17 und 3.18 angegebenen IC_{50} -Werten für die WNV-Protease handelt es sich ebenfalls um initiale IC_{50} -Werte. Auffällig sind des Weiteren die hohen Hill-Koeffizienten der Inhibitoren **C-109** und **C-114** bis **C-116** zwischen 2 und 4. Als mögliche Gründe für Hill-Koeffizienten > 1 nennt COPELAND einen kooperativen Bindungsmodus, die Besetzung mehrerer äquivalenter Bindetaschen oder aber eine Enzyminaktivierung, die nicht die Folge einer spezifischen Hemmung ist.²¹³ Solche Inaktivierungen können die Folge einer Proteinaggregation sein; eine solche Proteinaggregation ausgelöst durch Detergenzien wurde von POMÈS *et al.* beschrieben.²¹⁴ Bei den Inhibitoren mit dem abweichenden Hemmverhalten handelt es sich um amphiphile Strukturen, weshalb eine Wirkung als Detergens denkbar ist. Nach COPELAND sind gekrümmte Umsatzkurven ein Indiz für eine irreversible Enzym-Deaktivierung.²¹³ Daher ist eine Denaturierung oder Präzipitation der Protease als Folge einer vorangegangenen Inhibitor-Aggregation eine plausible Erklärung für die gemessenen Dosis-Wirkungs- und Umsatz-Kurven. Auch eine unspezifische Bindung der Protease an Inhibitoragglomerate ist möglich (*promiscuous binding*).²¹⁵⁻²¹⁶ Die unspezifische Bindung von Enzymen an Inhibitoragglomerate und auch die Agglomeratbildung selbst können zu einem gewissen Grad durch Zusatz von Detergenzien verhindert werden.²¹⁷ Da sowohl im ZIKV- als auch im WNV-Protease-Assay Triton X-100 (je 0,075 %) als Detergens verwendet wurde, aggregieren die Inhibitoren **C-109**, **C-114** bis **C-116** entweder trotz der Anwesenheit des Detergens oder die ungewöhnliche Kinetik ist auf eine andere Ursache zurückzuführen.

Tabelle 3.19 IC_{50} -Werte und Hill-Koeffizienten p der Inhibitoren mit nicht-linearen Umsatzkurven in Abhängigkeit vom betrachteten Zeitintervall. Initialer Wert: Messpunkte von 0 s bis 300 s; Finaler Wert: Messpunkte von 1500 s bis 1800 s.

	initial		final	
	IC_{50} [μ M]	p	IC_{50} [μ M]	p
C-109	25,8 \pm 0,4	4,00 \pm 0,14	16,7 \pm 0,6	4,48 \pm 0,97
C-114	27,3 \pm 0,3	3,31 \pm 0,12	20,5 \pm 0,6	4,28 \pm 0,78
C-116	2,14 \pm 0,09	2,64 \pm 0,18	1,04 \pm 0,08	3,86 \pm 0,68

Abbildung 3.15 (S.91) Enzymkinetische Charakterisierung der Inhibitoren **C-109** und **C-114** bis **C-116** mit der ZIKV-Protease. Die genauen Messbedingungen sind Kapitel 5.2 (S.157 f.) zu entnehmen. Umsatzkurven bei verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren **C-109** (A), **C-114** (C), **C-115** (E) und **C-116** (G); Dosis-Wirkungs-Kurven und Anpassungen an die logistische Gleichung (3, S.49) für Messpunkte aus verschiedenen Zeitintervallen der Inhibitoren **C-109** (B), **C-114** (D), **C-115** (F) und **C-116** (H).

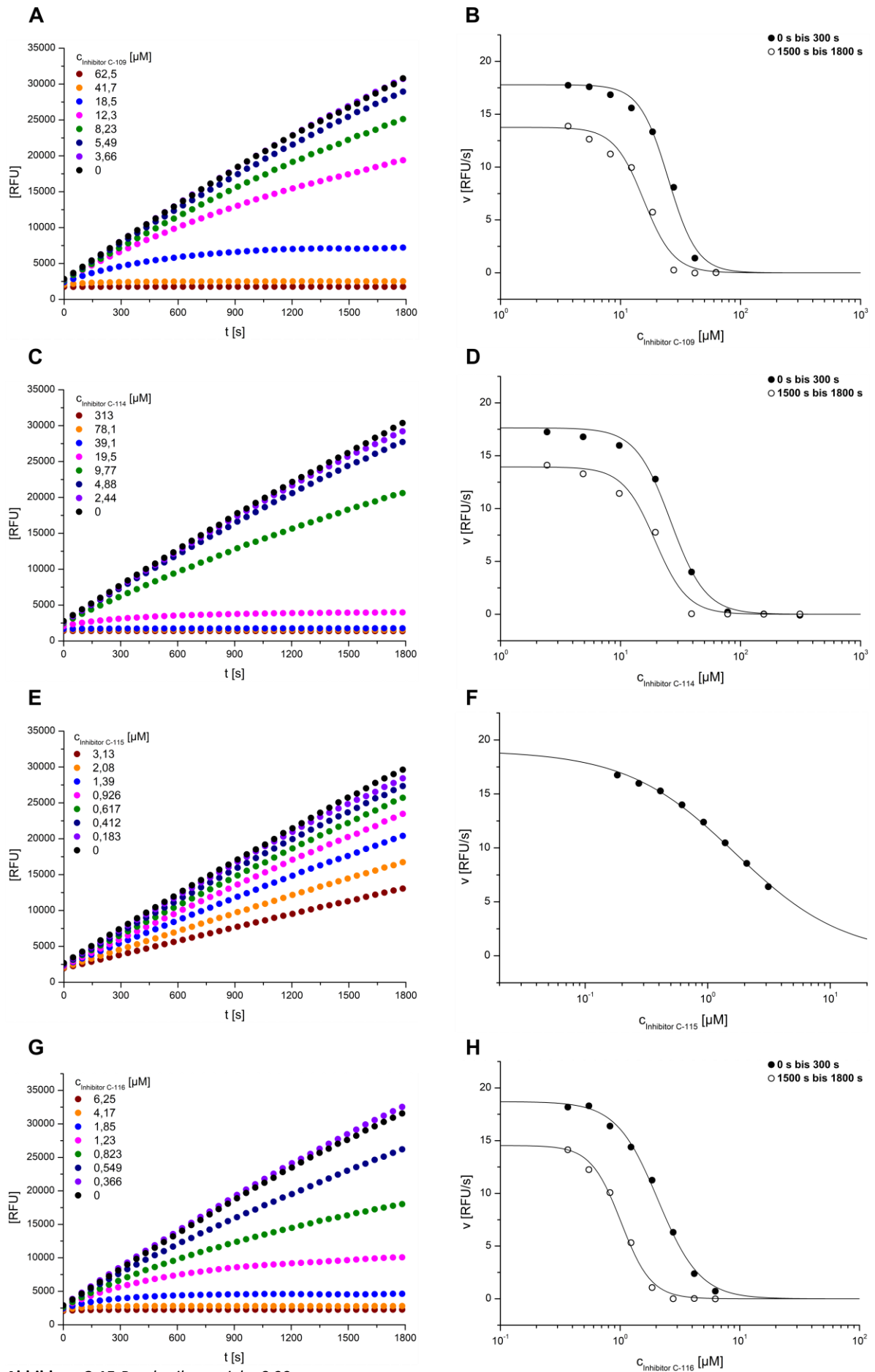


Abbildung 3.15 Beschreibung siehe S.90.

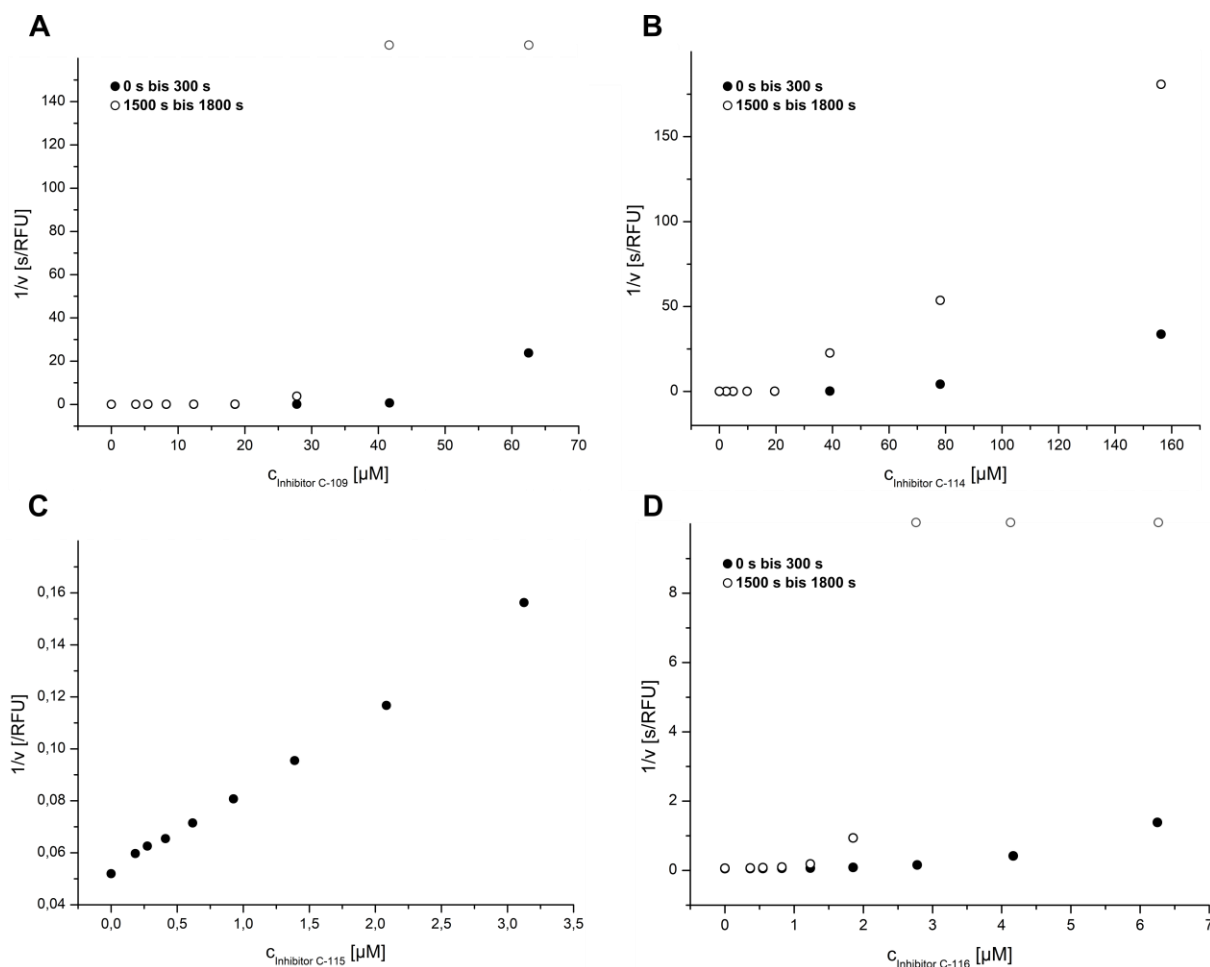
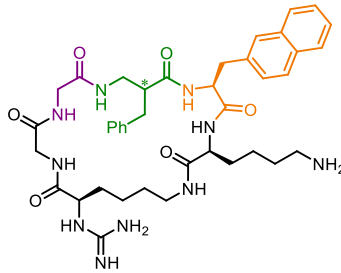


Abbildung 3.16 Dosis-Wirkungs-Kurven aufgetragen als $1/v$ gegen die Inhibitorkonzentration der Inhibitoren **C-109** (A), **C-114** (B), **C-115** (C) und **C-116** (D). Es sind z.T. Messpunkte aus verschiedenen Zeitintervallen für die Auswertung herangezogen worden. Die in Grau gezeigten Datenpunkte liegen außerhalb des Koordinatensystems. Die genauen Messbedingungen sind Kapitel 5.2 (S.157 f.) zu entnehmen.

Des Weiteren wurden zwei Derivate des Inhibitors **C-14** synthetisiert (Tab. 3.20); dabei wurde in die P4-Position racemisches β^2 -Homophenylalanin und in die P3-Position 2-Naphthylalanin eingebaut. Zwar gelang die Trennung der Inhibitoren **C-117** und **C-118** voneinander, die Stereochemie des P4-Rests ist allerdings nicht bekannt, da weder die Kristallisation einer der beiden Verbindungen im Komplex mit der ZIKV-Protease gelang noch die Hemmkonstanten Rückschlüsse auf die Konfiguration zulassen. Interessanterweise zeigen die Inhibitoren **C-117** und **C-118** bei Messungen mit der ZIKV-Protease unterschiedliche Hemmmodi (Abb. 3.17). Während beim Inhibitor **C-117** ein K_i -Wert mit der Gleichung für kompetitive Hemmung (2) berechnet werden kann, lassen sich die Messdaten von **C-118** nicht an diese Formel anpassen. Wegen des unbekanntem Hemmodus kann für **C-118** lediglich ein IC_{50} -Wert angegeben werden. Es ist interessant, dass sich die IC_{50} -Werte von **C-117** und **C-118** kaum voneinander unterscheiden. Anders als bei den oben beschriebenen Inhibitoren **C-109**, **C-114** und **C-116** trat bei Messungen mit dem Inhibitor **C-118** kein Abflachen der Umsatzkurven auf.

Tabelle 3.20 Derivate der Inhibitoren **C-44** und **C-45** mit 2-Naphthylalanin als P3-Rest.

Nr.		ZIKV-Pro.			WNV-Pro.	HPLC [%B]
		K_i [μM]	IC_{50} [μM]	p	K_i [μM]	
C-117	(1. Diastereomer)	$1,80 \pm 0,10$	$15,6 \pm 0,9$	$1,06 \pm 0,00$	$63,1 \pm 4,1$	35,8
C-118	(2. Diastereomer)	–	$15,1 \pm 0,7$	$1,59 \pm 0,03$	104 ± 1	37,4

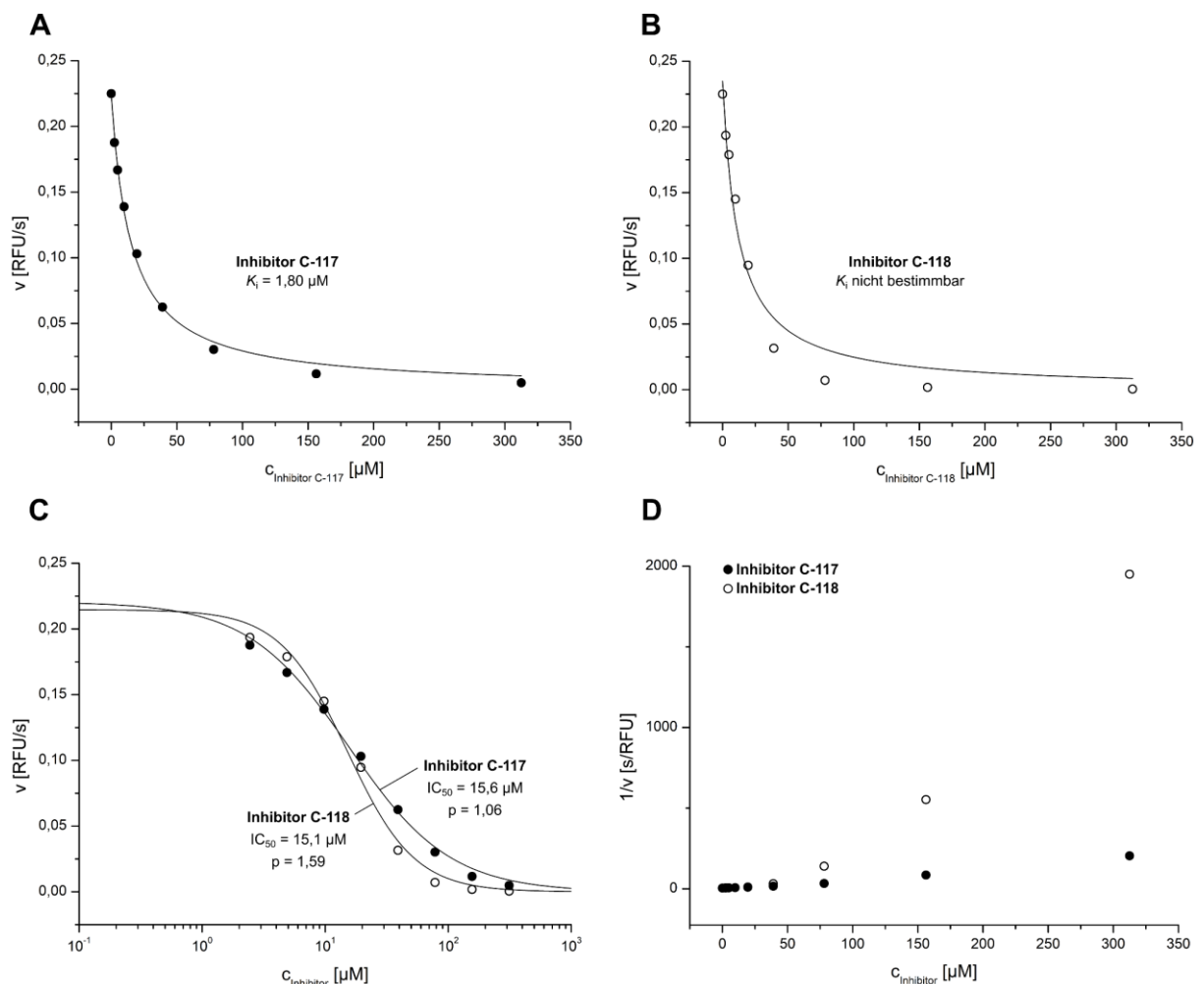


Abbildung 3.17 Hemmung der ZIKV-Protease durch die Inhibitoren **C-117** und **C-118**. Dosis-Wirkungs-Kurven und Anpassung an die Gleichung für kompetitive Hemmung (2, S.49) für die Inhibitoren **C-117** (A) und **C-118** (B). (C) Logarithmische Auftragung der Dosis-Wirkungs-Kurve und Anpassung an die logistische Gleichung (3, S.49). (D) Auftragung der Dosis-Wirkungs-Kurven als $1/v$ gegen die Inhibitorkonzentration. Die genauen Messbedingungen sind Kapitel 5.2 (S.157 f.) zu entnehmen.

An den HPLC-Retentionszeiten ist zu erkennen, dass die Verbindungen **C-102** bis **C-118** (zwischen 31 % B und 58 % B) deutlich lipophiler sind als die Leitstruktur **42** (HPLC: 17 % B). Aus den ermittelten K_i -Werten dieser lipophilen Inhibitoren wurde eine Formel zur Vorhersage von K_i -Werten kombinierter Derivate abgeleitet (Gleichung 4). Die Vorhersage erfolgt durch eine Reihenentwicklung von Inkrementen. Die Inkremente sind dabei die Quotienten aus den K_i -Werten einzelmodifizierter Inhibitoren j und dem K_i -Wert der Leitstruktur **42**, also die Faktoren, um die sich die K_i -Werte der Inhibitoren j im Vergleich zur Leitstruktur **42** verändern. Das Produkt der Inkremente der Inhibitoren j ergibt multipliziert mit dem K_i -Wert der Leitstruktur den $K_{i,calc}$ -Wert eines kombinierten Inhibitors. Die Inhibitoren j sind entsprechend den Veränderungen des kombinierten Inhibitors gegenüber der Leitstruktur auszuwählen. Zur Verdeutlichung ist die Bestimmung der $K_{i,calc}$ -Werte des Inhibitors **C-103** in Abbildung 3.18 schematisch dargestellt. Für die ZIKV-Protease stimmen die errechneten $K_{i,calc}$ -Werte gut mit den tatsächlich gemessenen K_i -Werten überein (Tab. 3.21). Gleiches gilt für die $K_{i,calc}$ -Werte der WNV-Protease; bei diesen ist allerdings eine leichte Tendenz hin zu $K_i/K_{i,calc}$ -Verhältnissen < 1 zu erkennen. Das heißt, dass die tatsächlich gemessenen K_i -Werte für die WNV-Protease im Allgemeinen niedriger liegen, als durch die Reihenentwicklung zu erwarten gewesen wäre.

$$K_{i,calc} = K_i(\text{Inhibitor } \mathbf{42}) \times \prod_{j=1}^n \frac{K_i(\text{Inhibitor } j)}{K_i(\text{Inhibitor } \mathbf{42})} \quad (4)$$

ZIKV-Protease: $K_i(\text{Inhibitor } \mathbf{42}) = 0,00168 \mu\text{M}$; WNV-Protease: $K_i(\text{Inhibitor } \mathbf{42}) = 0,149 \mu\text{M}$; die Kombination der Einzelmodifikationen der Inhibitoren j ergibt das Substitutionsmuster des Inhibitors, für den $K_{i,calc}$ berechnet werden soll; die Reihe ist daher über alle K_i -Werte dieser Inhibitoren j zu entwickeln.

Tabelle 3.21 Durch Reihenentwicklung berechnete $K_{i,calc}$ -Werte kombinierter Inhibitoren gemäß Gleichung (4).

Nr.	Inhibitoren j	ZIKV-Protease			WNV-Protease		
		K_i [μM]	$K_{i,calc}$ [μM]	$K_i/K_{i,calc}$	K_i [μM]	$K_{i,calc}$ [μM]	$K_i/K_{i,calc}$
C-102	C-7, C-62	0,299	0,0735	4,1	2,97	1,80	1,7
C-103	C-7, C-65	0,148	0,102	1,5	8,96	13,7	0,65
C-104	C-7, C-65, C-132 ^a	0,435	0,398	1,1	7,94	33,5	0,24
C-105	C-7, C-73	0,0141	0,00575	2,5	0,519	0,485	1,1
C-106	C-7, C-53, C-73	0,0339	0,0609	0,56	0,907	3,14	0,29
C-107	C-7, C-63, C-73	0,254	0,203	1,3	2,23	4,98	0,45
C-108	C-7, C-65, C-73	0,259	0,165	1,6	1,78	16,6	0,11
C-110	C-7, C-39	0,00428	0,0148	0,29	0,993	1,95	0,51
C-111	C-8, C-39	0,00637	0,00963	0,66	0,843	1,08	0,78
C-112	C-10, C-39	0,0125	0,0249	0,50	0,983	1,63	0,60
C-113	C-7, C-39, C-73	0,145	0,0237	6,1	0,803	2,39	0,34
C-115	C-7, C-63, C-73	0,245	0,203	1,2	6,22	4,98	1,2

^aSiehe Tab. 3.24, S.105.

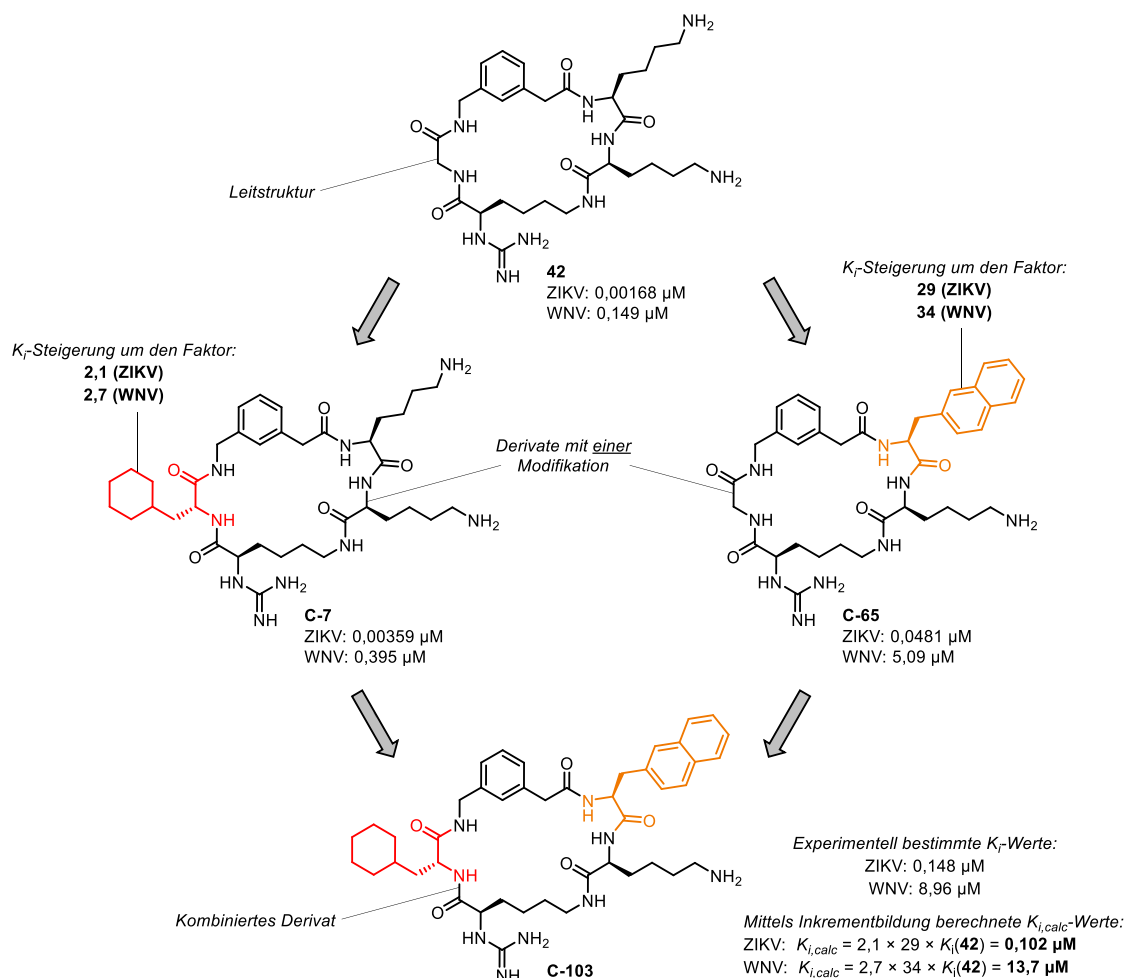
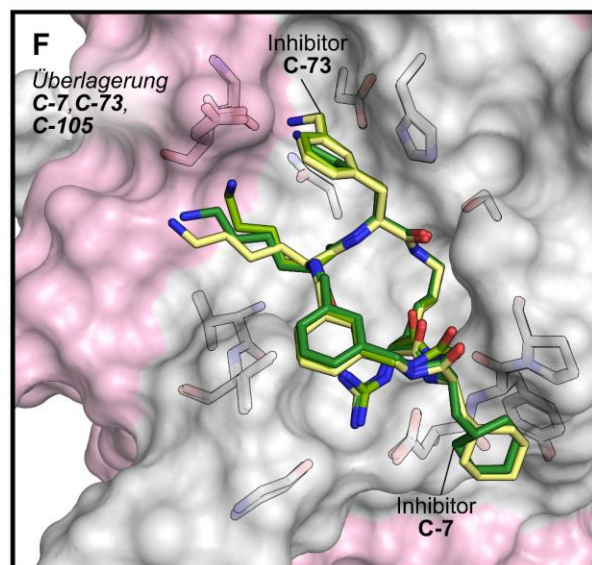
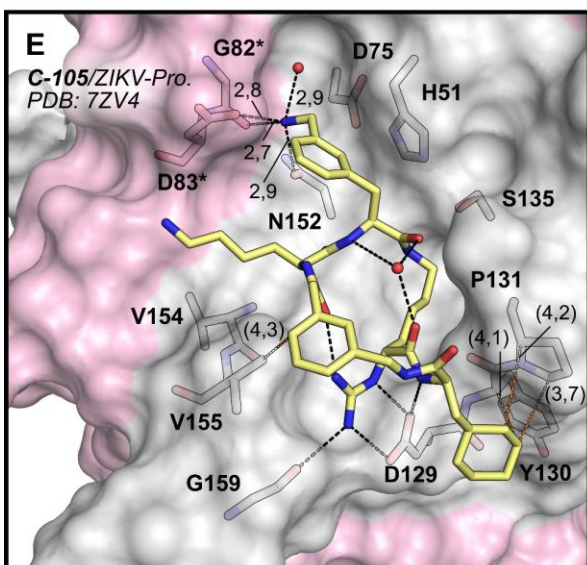
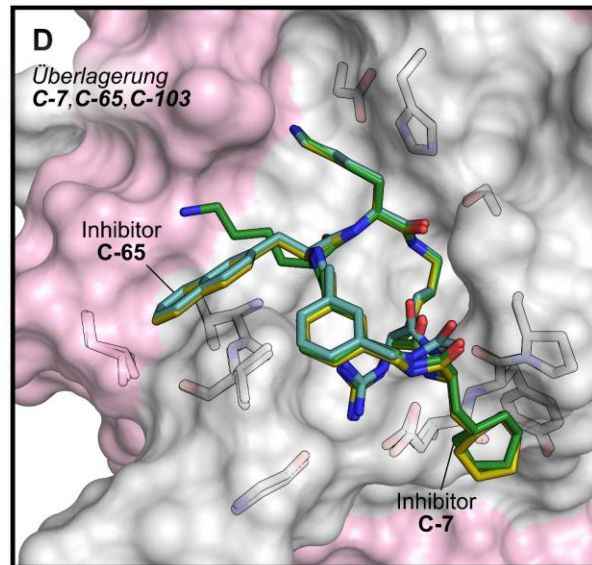
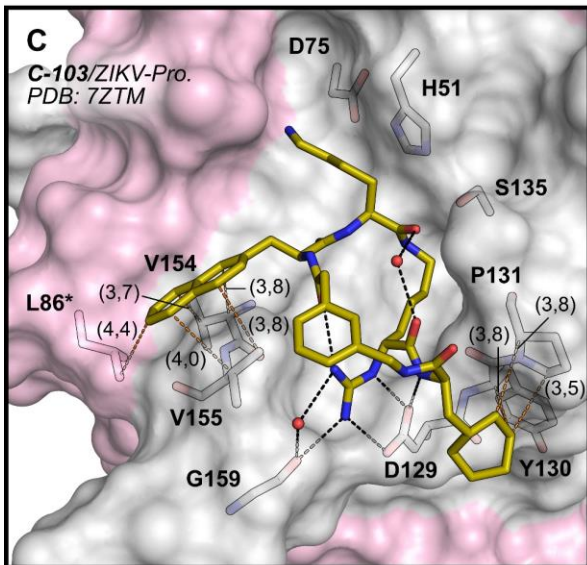
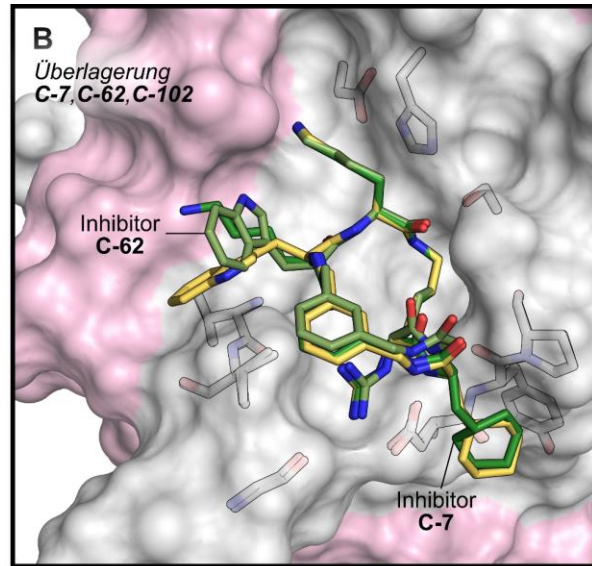
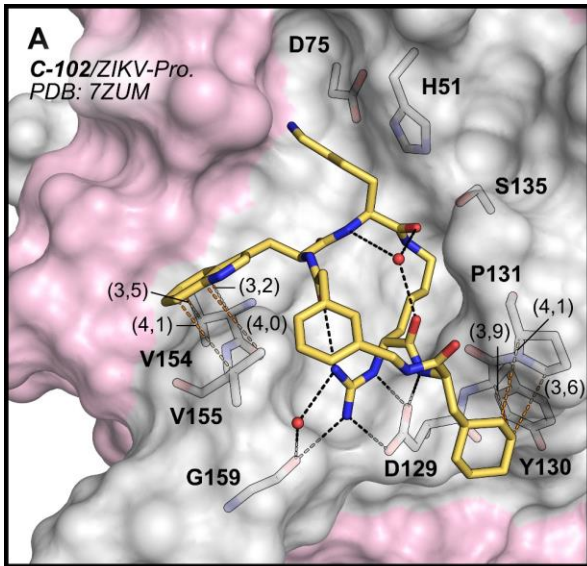


Abbildung 3.18 Vorgehen zur Berechnung eines $K_{i,calc}$ -Wertes gemäß der Reihenentwicklung nach Gleichung (4). Es ist exemplarisch die Berechnung des $K_{i,calc}$ -Wertes des Inhibitors **C-103** gezeigt, der im Vergleich zur Leitstruktur **42** in P ω - und P3-Position modifiziert wurde. Die zugehörigen einzelmodifizierten Derivate sind die Inhibitoren **C-7** und **C-65**; die Faktoren, um die sich die K_i -Werte der einzelmodifizierten Derivate im Vergleich zur Leitstruktur **42** verändern, sind die Inkremente. Die Multiplikation der Inkremente mit dem K_i -Wert der Leitstruktur **42** ergibt den $K_{i,calc}$ -Wert.

Von vier der lipophilen kombinierten Derivate wurden Kristallstrukturen im Komplex mit der ZIKV-Protease bestimmt (Abb. 3.19, S.96-97). In diesen findet sich eine strukturelle Erklärung dafür, dass sich die K_i -Werte kombinierter Derivate in guter Näherung mittels des oben vorgestellten Inkrementensystems abschätzen lassen: In der Regel sind die im Vergleich zur Leitstruktur **42** veränderten Reste der kombinierten Derivate analog zu den entsprechenden Resten der einzelmodifizierten Inhibitoren ausgerichtet. Ein von dieser Regel abweichendes Verhalten zeigt der Inhibitor **C-102**, der ausgehend von den Inhibitoren **C-7** (P ω -D-Cha) und **C-62** (P3-Trp) kombiniert wurde, bezüglich seiner P3-Seitenkette (Abb. 3.19A). Beim Inhibitor **C-102** ist das Indolsystem des P3-Rests in einem für hydrophobe Wechselwirkungen typischen Abstand oberhalb von V154 und V155 positioniert. Beim P3-Tryptophan-Derivat **C-62** hingegen ist das Indolsystem im Vergleich zu **C-102** um 90° gekippt und ragt ins Lösungsmittel hinein (s. Überlagerung in Abb. 3.19B). Die ungewöhnliche Ausrichtung der P3-Seitenkette des Inhibitors **C-62** wurde bereits im Kapitel 3.2.3 (S.78) diskutiert.



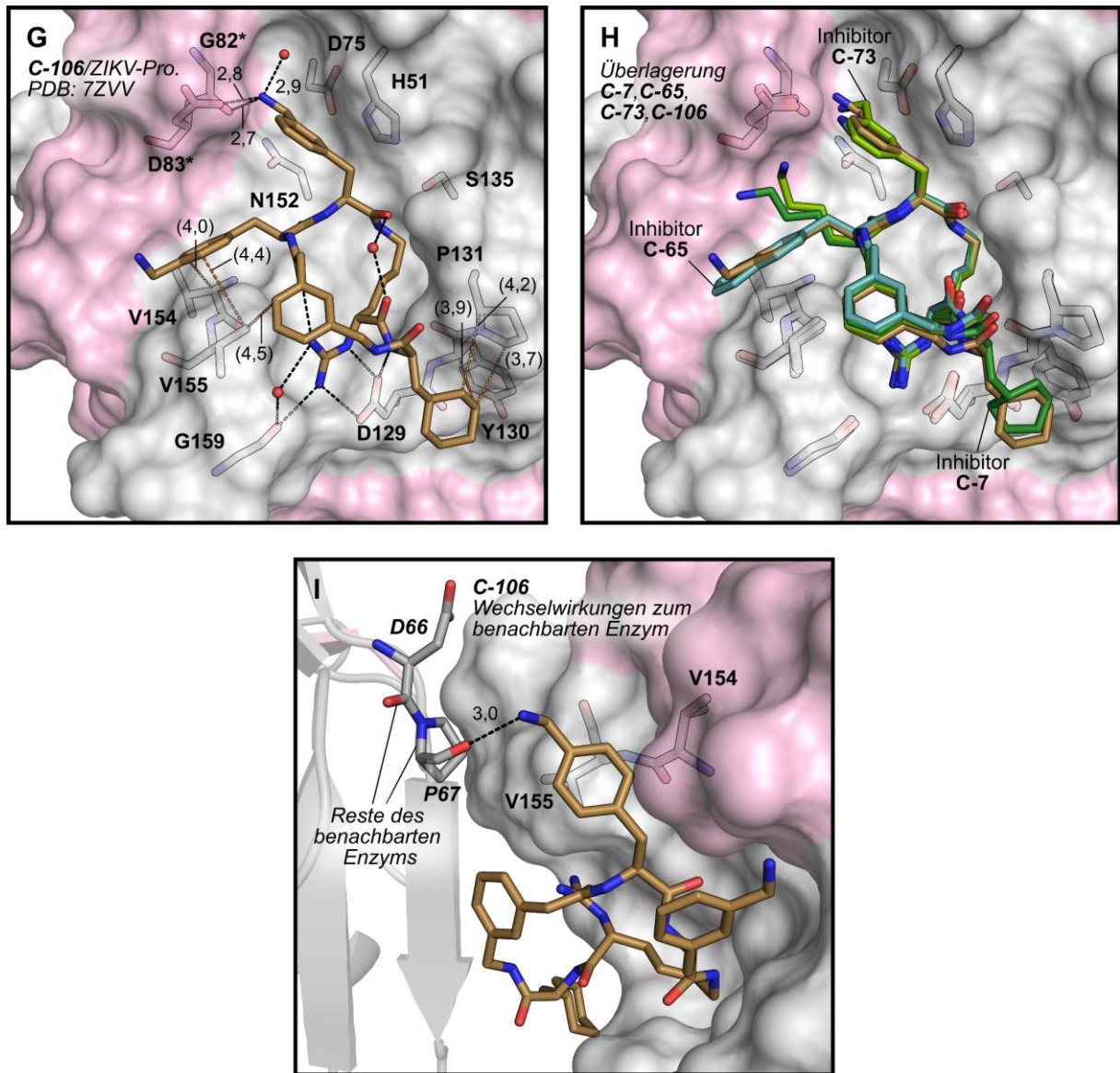


Abbildung 3.19 Komplexkristallstrukturen kombinierter lipophiler Inhibitoren. Interaktionen zwischen dem Inhibitorrückgrat und dem Enzym sind nicht gezeigt. Interaktionen des P2-Rests mit dem Enzym sind nur in den Tafeln E und G gezeigt. Längen sind nur für polare Wechselwirkungen zwischen Enzym und P4-, P3- bzw. P2-Rest sowie für gezeigte Van-der-Waals-Kontakte angegeben. In den Überlagerungen ist nur die stärker besetzte Konformation des Inhibitors **C-7** gezeigt. (A) Inhibitor **C-102** im Komplex mit der ZIKV-Protease. (B) Überlagerung der Komplexkristallstrukturen der Inhibitoren **C-7**, **C-62** und **C-102**, die Enzymoberfläche entstammt der Komplexkristallstruktur des Inhibitors **C-102**. (C) Inhibitor **C-103** im Komplex mit der ZIKV-Protease. (D) Überlagerung der Komplexkristallstrukturen der Inhibitoren **C-7**, **C-65** und **C-103**, die Enzymoberfläche entstammt der Komplexkristallstruktur des Inhibitors **C-103**. (E) Inhibitor **C-105** im Komplex mit der ZIKV-Protease. (F) Überlagerung der Komplexkristallstrukturen der Inhibitoren **C-7**, **C-73** und **C-105**, die Enzymoberfläche entstammt der Komplexkristallstruktur des Inhibitors **C-105**. (G) Inhibitor **C-106** im Komplex mit der ZIKV-Protease. (H) Überlagerung der Komplexkristallstrukturen der Inhibitoren **C-7**, **C-65**, **C-73** und **C-106**, die Enzymoberfläche entstammt der Komplexkristallstruktur des Inhibitors **C-106**. (I) Wechselwirkungen des Inhibitors **C-106** mit Resten des benachbarten Enzyms der Kristallpackung; die Reste des Nachbarenszyms wurden in PyMOL mit dem Befehl *A/generate/symmetry mates* in der unbearbeiteten PDB-Datei 7ZVV erzeugt. Auflösungen: (A) 1,75 Å; (C) 1,45 Å; (E) 1,69 Å; (G) 1,75 Å. Röntgenstrukturanalyse durch S. HUBER (AG STEINMETZER).

Die Ausrichtung der P3-Seitenkette des Inhibitors **C-102** dagegen entspricht jener der Inhibitoren **C-58** und **C-65** (vgl. Abb. 3.13D und F, S.79), die ebenfalls jeweils eine aromatische P3-Seitenkette besitzen. Im Übrigen entspricht die Konformation des zweifach modifizierten Inhibitors **C-102** denjenigen der einzelmodifizierten Verbindungen: Das Linkersegment und die P ω -Seitenkette decken sich mit der des Inhibitors **C-7**; das P2-P1-Segment ist beim Inhibitor **C-102** nahezu identisch positioniert wie bei **C-7** und **C-62** und damit auch wie bei der Leitstruktur **42**.

Die gebundene Konformation des Inhibitors **C-103** (Abb. 3.19C und D), der auf Basis der Inhibitoren **C-7** (P ω -D-Cha) und **C-65** (P3-2-Nal) kombiniert wurde, entspricht im Bereich des P2-P1-Segments ebenfalls denjenigen der einzelmodifizierten Inhibitoren; der P3-Rest ist identisch wie bei **C-65** und das Linkersegment identisch wie bei **C-7** ausgerichtet. Beim Inhibitor **C-105** (Abb. 3.19E und F), der sich vom P ω -D-Cyclohexylalanin-Derivat **C-7** und vom P2-3-Aminomethylphenylalanin-Derivat **C-73** ableitet, deckt sich die Konformation des kombinierten Inhibitors erneut weitgehend mit denjenigen der einzelmodifizierten Derivate. Eine interessante Abweichung betrifft den P3-Rest, der sowohl beim kombinierten Derivat **C-105** als auch bei **C-7** und **C-73** jeweils ein Lysin ist. Die P3-C α -C β -Bindung ist beim Inhibitor **C-105** im Vergleich zu denjenigen von **C-7** und **C-73** um 29° bzw. 23° von der Enzymoberfläche weggekippt. Derartige Verkippungen waren bisher nur bei Inhibitoren mit aromatischem P3-Rest beobachtet worden (**C-58**, **C-65**, **C-102**, **C-103**). Beim Inhibitor **C-106**, bei dem im Vergleich zu **C-105** das P3-Lysin durch ein 4-Aminomethylphenylalanin ersetzt wurde, findet sich diese Verkippung ebenfalls (Abb. 3.19G und H). In diesem Falle ist sie jedoch auf die Ausbildung von Van-der-Waals-Kontakten zwischen der aromatischen P3-Seitenkette und den hydrophoben Seitenketten von V154 und V155 zurückzuführen. In der Komplexstruktur geht die terminale Aminogruppe des P3-Rests keine sichtbare Wechselwirkung mit dem Enzym ein.

Da die Elektronendichte des C-terminalen Loops der NS2B-Kette in der Komplexstruktur des Inhibitors **C-106** nicht aufgelöst ist, liegt möglicherweise dennoch eine Wechselwirkung zwischen dem Enzym und der Aminogruppe des P3-Rests vor. Eine solche Wechselwirkung zwischen einem P3-Lysin und D90* wurde von MARTIN *et al.*¹⁸⁰ für einen peptidischen Inhibitor im Komplex mit der WNV-Protease beobachtet, was im Kapitel 3.2.3 (S.78) diskutiert wurde. Eine weitere mögliche Ursache für die Ausrichtung der Aminogruppe weg von der Enzymoberfläche ist die Wechselwirkung mit Resten eines benachbarten Enzyms im Kristall. Der Generierung von *symmetry-mates* aus der unbearbeiteten PDB-Datei der Komplexstruktur des Inhibitors **C-106** im Programm *PyMOL* zufolge kommen die Reste D66 und P67 des Nachbarenzyms der terminalen Aminogruppe des P3-Rests so nahe, dass eine Ausbildung von polaren Wechselwirkungen möglich ist (Abb. 3.19I). Darüber hinaus ist an der Struktur des Inhibitors **C-106** die Ausrichtung des P2-Rests bemerkenswert. Bei den im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Inhibitoren mit P2-Lysin und auch den Inhibitoren **C-73** und **C-105** mit 3-Aminomethylphenylalanin als P2-Rests wird immer die Ausbildung einer polaren Wechselwirkung zur Seitenkette des N152 beobachtet. Im Falle von **C-106** ist die terminale Aminogruppe des

P2-3-Aminomethylphenylalanins nicht zum N152 hin ausgerichtet: Wegen eines abweichenden Diederwinkels liegt die terminale Kohlenstoff-Stickstoffbindung in einer Ebene mit dem aromatischen System des P2-Rests und zeigt direkt in Richtung D83*, was eine Wechselwirkung mit N152 unmöglich macht. Des Weiteren ist das Rückgrat des P ω -Rests von **C-106** im Vergleich zu dem des Inhibitors **C-7** und denen der übrigen kombinierten Derivate etwas näher am D129 positioniert.

3.3.3 Analoga zellpenetrierender Peptide

Wie bereits erwähnt, gelang YOSHIDA *et al.* durch die Kombination argininreicher und hydrophober Segmente die Entwicklung des cyclischen, zellpenetrierenden DENV2-Proteaseinhibitors **19b** (Abb. 3.20, S.100).¹⁶⁵ Der Inhibitor **19b** wurde von argininreichen zellpenetrierenden Peptiden mit einem zusätzlichen, hydrophoben Phe-2-Nal-Motiv abgeleitet. Dieser Typ zellpenetrierender Peptide war ursprünglich von PEI entwickelt worden; ein Beispiel für diesen Peptidtyp ist **57**.^{176-177,218} Ein weiteres Beispiel für den erfolgreichen Einsatz zellpenetrierender Peptide ist der von RADEMANN *et al.* entwickelte Inhibitor **8f**. Bei diesem wurde durch die kovalente Verknüpfung des zellpenetrierenden, argininreichen TAT-Peptids über ein Dextrangerüst mit einem Flavivirininhibitor eine Hemmwirkung auf das ZIKV, WNV und DENV2 in Zellkultur erreicht.¹⁴⁵ Der Gruppe um LINDBERG gelang mit cyclischen zellpenetrierenden Peptiden wie **58** die intrazelluläre Hemmung von Proprotein-konvertasen.²¹⁹ Diese zellpenetrierenden Peptide besitzen allesamt argininreiche Sequenzen und sind außerdem reich an hydrophoben Resten. STEINMETZER *et al.* diskutierten außerdem die Anlagerung und anschließende endozytotische Aufnahme argininreicher Furininhibitoren wie **59** mit signifikanter Aktivität gegen die Vermehrung des Chikungunya- (CHIKV) und des Semliki-Forest-Virus (SFV).²²⁰ Eine Übersicht über lineare und cyclische zellpenetrierende Peptide einschließlich möglicher Internalisierungsmechanismen und Anwendungen zu therapeutischen Zwecken geben Artikel von JAFARI und JAIN.²²¹⁻²²²

In den Kapiteln zu P3- bzw. P2-modifizierten Derivaten der Leitstruktur **42** wurde gezeigt, dass die Inhibitoren **C-51** (P3-Arg) und **C-72** (P2-Arg) eine hohe Affinität zur ZIKV- und zur WNV-Protease besitzen. Die hohe Affinität dieser Arginin-Derivate sowie der Inhibitoren mit hydrophobem, D-konfiguriertem P ω -Rest wurde zum Anlass genommen, ausgehend von der Leitstruktur **42** zellpenetrierende Inhibitoren zu entwickeln (Tab. 3.22, S.101). Zunächst wurde der Inhibitor **C-119** mit Arginin in P3- und P2-Position sowie D-Homocyclohexylalanin in P ω -Position synthetisiert. Von PEI *et al.* wurden Peptide, die die Sequenz Phe-2-Nal-Arg₄ enthalten, als zellpenetrierend identifiziert.¹⁷⁶ Um dieses Sequenzmotiv mit der Grundstruktur der in dieser Arbeit vorgestellten Inhibitoren zu vereinen, wurden die Verbindungen **C-120** bis **C-123** hergestellt. Ausgangsstruktur für

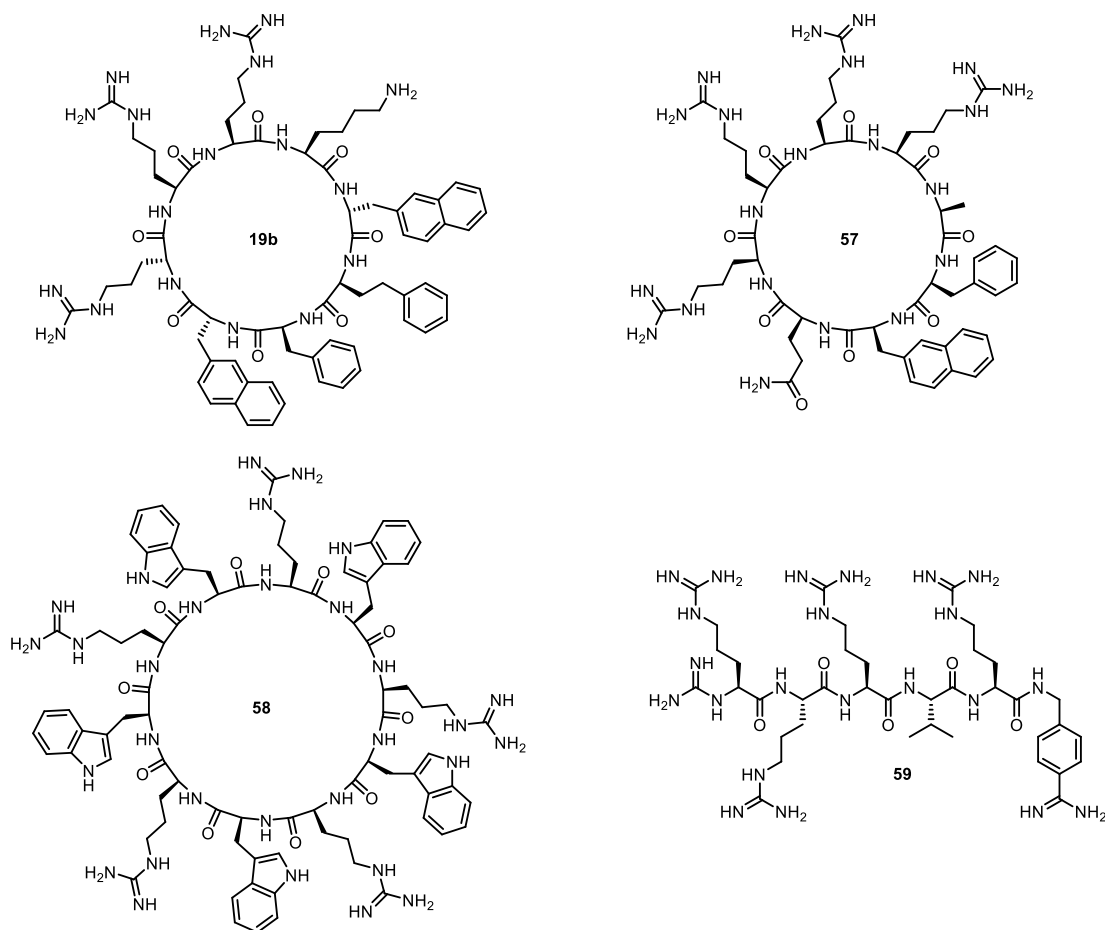
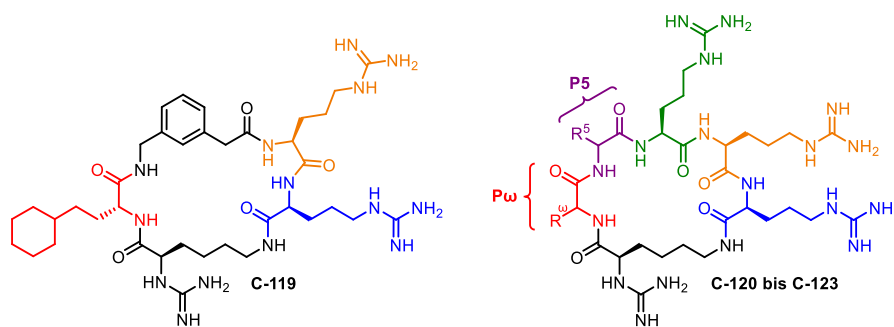


Abbildung 3.20 Beispiele für zellpenetrierende Inhibitoren und Peptide: Der DENV2-Proteaseinhibitor **19b**, der auf Grundlage des zellpenetrierenden Peptids **57** entwickelt wurde, der Proproteinkonvertaseinhibitor **58** und der Furininhibitor **59**.

diese Verbindungen war der Inhibitor **C-16** mit einer Gly₃-Sequenz als Linker (vgl. Tab. 3.6, S.62). Die Inhibitoren **C-120** bis **C-123** enthalten zwar im P4-P2-Segment nur ein Arg₃-Motiv, wegen des in P1-Position eingebauten guanylierten D-Lysins ist das P4-P1-Segment einer Arg₄-Sequenz strukturell dennoch sehr ähnlich. Die hydrophoben Reste wurden in P_ω- und P5-Position eingebaut. Bei der Verbindung **C-120** wurde das Phe-2-Nal-Motiv nach PEI direkt übernommen. Da Flavivirin eine Präferenz für D-konfigurierte P_ω-Reste aufweist, wurde beim Inhibitor **C-121** D-Phenylalanin als P_ω-Rest verwendet; des Weiteren wurde D-Homocyclohexylalanin getestet (**C-122**), da der Inhibitor **C-8** mit diesem P_ω-Rest einer der stärksten Flavivirininhibitoren ist (vgl. Tab. 3.5, S.57). Beim Inhibitor **C-123** wurde D-Phe-Phe als hydrophobe P_ω-P5-Sequenz eingebaut.

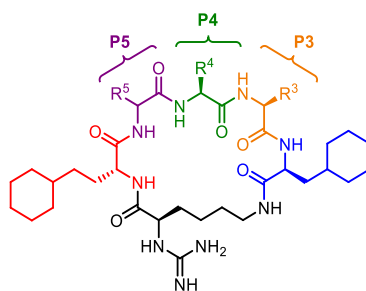
Ein weiteres typisches Strukturmotiv amphiphiler zellpenetrierender Peptide ist eine alternierende Sequenz aus basischen und hydrophoben Aminosäuren.^{219,223-224} Die Inhibitoren **C-124** bis **C-128** (Tab. 3.23) besitzen solch eine alternierende Sequenz mit Cyclohexylalanin als P2-Rest, dem guanylierten, über die Seitenkette verknüpften D-Lysin in P1-Position und D-Homocyclohexylalanin als P_ω-Rest. Die Reste des P5-P3-Segments wurden variiert, wobei in P5- und P3-Position basische Reste (Lys, Arg, D-Arg oder hArg) und in P4-Position ein hydrophober Rest (Cha oder Phe) eingebaut wurde.

Tabelle 3.22 Argininreiche Inhibitoren mit hydrophobem Segment.



	P ω	P5	ZIKV-Protease		WNV-Protease		HPLC [%B]
			IC ₅₀ [μ M]	p	IC ₅₀ [μ M]	p	
C-119	D-hCha	–	0,711 \pm 0,021	1,34 \pm 0,05	4,72 \pm 0,46	1,76 \pm 0,12	35,6
C-120	Phe	2-Nal	0,310 \pm 0,052	3,96 \pm 0,44	1,81 \pm 0,18	1,89 \pm 0,06	34,7
C-121	D-Phe	2-Nal	0,380 \pm 0,060	1,92 \pm 0,16	12,4 \pm 0,5	1,08 \pm 0,01	35,4
C-122	D-hCha	2-Nal	0,750 \pm 0,063	4,74 \pm 0,24	2,67 \pm 0,15	1,12 \pm 0,02	41,3
C-123	D-Phe	Phe	0,685 \pm 0,019	0,76 \pm 0,01	42,5 \pm 0,7	1,14 \pm 0,04	30,7

Tabelle 3.23 Inhibitoren mit alternierend hydrophoben und basischen Resten.



	P5	P4	P3	ZIKV-Protease		WNV-Protease		HPLC [%B]
				IC ₅₀ [μ M]	p	IC ₅₀ [μ M]	p	
C-124	Lys	Cha	Lys	32,8 \pm 1,1	1,56 \pm 0,05	131 \pm 4	1,46 \pm 0,04	41,4
C-125	Arg	Cha	Lys	16,1 \pm 1,3	1,87 \pm 0,05	67,1 \pm 3,0	1,49 \pm 0,04	41,4
C-126	Lys	Phe	Lys	52,2 \pm 3,6	1,28 \pm 0,02	196 \pm 11	1,34 \pm 0,05	39,6
C-127	Arg	Phe	hArg	10,6 \pm 0,8	1,21 \pm 0,02	295 \pm 14	1,19 \pm 0,04	39,3
C-128	D-Arg	Phe	hArg	11,6 \pm 1,2	1,40 \pm 0,13	39,9 \pm 7,6	1,21 \pm 0,03	43,0

Den Inhibitoren beider Serien (**C-119** bis **C-128**) ist eine Abweichung vom kompetitiven Hemmmodus gemein. Aus diesem Grund sind in den Tabellen 3.22 und 3.23 anstelle von K_i -Werten IC₅₀-Werte angegeben. Wie schon bei den Inhibitoren **C-109**, **C-114** und **C-116** wurden zum Teil Hill-Koeffizienten > 1 bestimmt; des Weiteren zeigen die Messwerte der Inhibitoren **C-119** bis **C-128** bei der Auftragung von $1/v$ gegen die Inhibitorkonzentration einen parabolischen Verlauf. In Abbildung 3.21 (S.103) sind

exemplarisch die IC₅₀-Kurven des Inhibitors **C-122** mit der ZIKV-Protease (A) und der WNV-Protease (B) sowie die entsprechenden Auftragungen von 1/v als Funktion der Inhibitorkonzentration (C, D) gezeigt. Zu Vergleichszwecken sind zusätzlich die Kurven des Inhibitors **C-101** gezeigt. Der Inhibitor **C-101** hemmt die ZIKV- und die WNV-Protease ähnlich effektiv wie **C-122**, jedoch mit einem kompetitiven Hemmmodus (vgl. Tab. 3.16, S.86).

Wie zuvor diskutiert, wurde das abweichende Hemmverhalten der Inhibitoren **C-109**, **C-114** und **C-116** als Folge einer irreversiblen Enzym-Inaktivierung interpretiert (Kapitel 3.3.2, S.89 ff.). Wesentlicher Anhaltspunkt für diese Interpretation war das Abflachen der Umsatzkurven mit zunehmender Messdauer, ohne dass dabei ein *steady-state*-Zustand mit konstanter Umsatzgeschwindigkeit erreicht wurde. Da dieses Abflachen bei den Inhibitoren **C-119** bis **C-128** nicht auftrat, muss das ungewöhnliche Hemmverhalten dieser Verbindungen eine andere Ursache haben. Für einer Serie von Furininhibitoren erhielten STEINMETZER *et al.* vergleichbare Messergebnisse mit parabolischen Kurvenverläufen bei der Auftragung von 1/v als Funktion der Inhibitorkonzentration.²²⁵ Als eine mögliche Ursache diskutierten die Autoren die Bindung der Inhibitoren mit unterschiedlichen Modi im aktiven Zentrum. Analog ist es bei den Inhibitoren **C-119** bis **C-123** denkbar, dass deren Arginin-Reste bzw. das guanilierte D-Lysin nicht nur in der erwarteten Weise in die Bindetaschen der Protease binden. Beispielsweise könnte die S1-Tasche vom P2-Arginin und die S2-Tasche vom P3-Arginin besetzt werden; eine Besetzung der Bindetaschen in umgekehrter Reihenfolge (also das P3-Arginin in die S1-Tasche, das P2-Arginin in die S2-Tasche und der P1-Rest in den S3/4-Bereich) wäre ebenfalls möglich. Des Weiteren ist die gleichzeitige Bindung der Inhibitoren **C-119** bis **C-128** an verschiedene Bindestellen, das heißt ins aktive Zentrum und in eine allosterische Tasche, eine mögliche Ursache für die erhaltenen Messkurven. NEUBERT *et al.* beschrieben einen solchen gemischten Hemmmechanismus für vom TAT-Protein abgeleitete Dipeptidylpeptidase-IV-Inhibitoren,²²⁶ JUNQUEIRA *et al.* postulierten die Bindung von Benzamidin-Derivaten in zwei verschiedene Bindetaschen des bovinen Trypsins.²²⁷ In beiden Fällen waren in enzymkinetischen Messungen parabolische Kurvenverläufe in der Auftragung 1/v gegen die Inhibitorkonzentration aufgetreten. Des Weiteren sind unterschiedliche, von der Inhibitorkonzentration abhängige Affinitäten der Inhibitoren **C-119** bis **C-128** zur offenen und zur geschlossenen Konformation des Flavivirins möglich. Dazu kann die vermeintlich parabolische Kurve auch als biphasischer Verlauf zweier linearer Zusammenhänge aufgefasst werden.²²⁵ In einem solchen Falle würde der Inhibitor in niedriger Konzentration vornehmlich an die offene, inaktive Konformation binden. Ab einer kritischen Konzentration (für den Inhibitor **C-122** ca. 0,75 µM bei der ZIKV-Protease und ca. 15 µM bei der WNV-Protease) hingegen würde der Inhibitor vornehmlich an die geschlossene, aktive Konformation binden, woraus sich zwei lineare Korrelationen ergeben würden. Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der starken Zunahme der Hemmwirkung in einem engen Konzentrationsbereich ist die Überschreitung einer kritischen Mizellbildungskonzentration. Die Verbindungen **C-119** bis **C-128** haben einen ausgeprägten amphiphilen Charakter, was die Bildung von Mizellen bei hohen

Inhibitorkonzentrationen in wässrigen Lösungen plausibel macht. Bindet ein Inhibormolekül, das in einer Mizelle organisiert ist, an ein aktives Zentrum, so ist in der Umgebung des Enzyms die Inhibitorkonzentration lokal stark erhöht. Dadurch ist nach Dissoziation des initialen Enzym-Inhibitor-Komplexes die Bildung eines neuen Komplexes sehr viel wahrscheinlicher. Des Weiteren würde die Bildung von Mizellen den hohen Hill-Koeffizienten erklären (Hill-Koeffizienten > 1 zeigen einen kooperativen Bindungsmodus an). Für amphiphile, tribasische Furininhibitoren ist ein kooperativer Hemmmechanismus durch Mizellbildung beschrieben und experimentell belegt.²²⁸

Einige der potentiell zellpenetrierenden Inhibitoren wurden *in cellulo* auf ihre antivirale Wirkung untersucht und zeigten dabei eine im Vergleich zur Leitstruktur **42** deutlich höhere Wirksamkeit (s. Kap. 3.7, S.113 ff.).

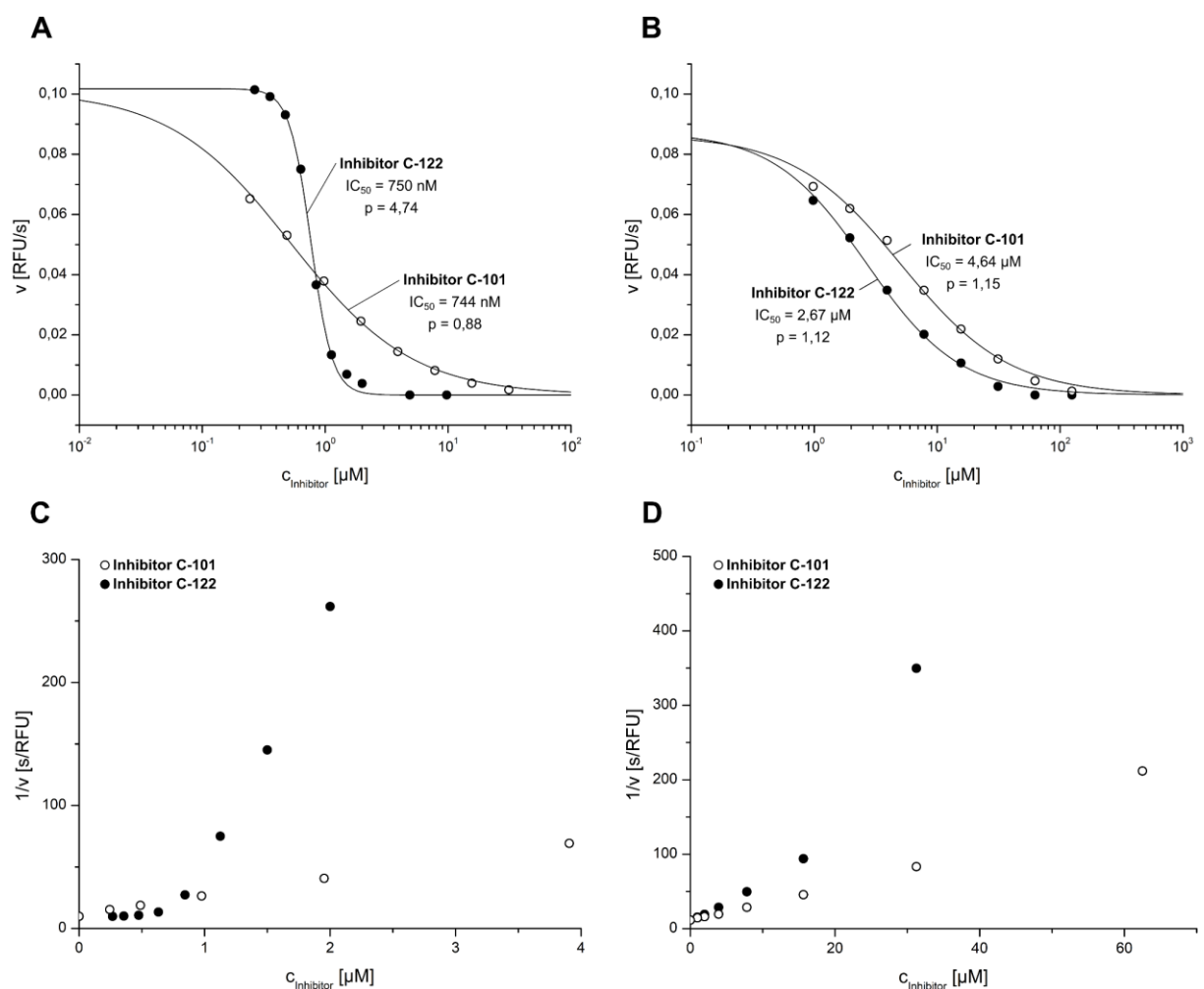


Abbildung 3.21 Dosis-Wirkungs-Kurven des Inhibitors **C-122**; zur Illustration des ungewöhnlichen Hemmverhaltens von **C-122** sind die Dosis-Wirkungs-Kurven des kompetitiven Inhibitors **C-101**, für den ähnliche IC_{50} -Werte wie für **C-122** bestimmt wurden, zum Vergleich gezeigt. Die genauen Messbedingungen sind Kapitel 5.2 (S.157 f.) zu entnehmen. **(A)** Dosis-Wirkungs-Kurven der Messungen mit der ZIKV-Protease und Anpassung an die logistische Gleichung (3). **(B)** Dosis-Wirkungs-Kurven der Messungen mit der WNV-Protease und Anpassung an die logistische Gleichung (3, S.49). **(C)** Auftragung der Dosis-Wirkungs-Kurven bei Messung mit der ZIKV-Protease als $1/v$ gegen die Inhibitorkonzentration. **(D)** Auftragung der Dosis-Wirkungs-Kurven bei Messung mit der WNV-Protease als $1/v$ gegen die Inhibitorkonzentration.

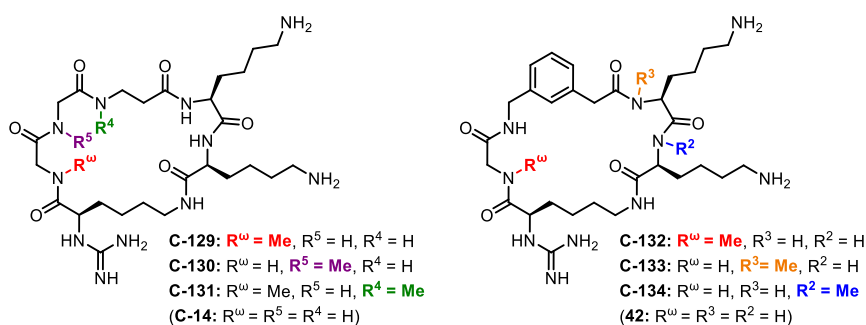
3.4 Methylierungen des Inhibitorrückgrats

Es sind zahlreiche cyclische Peptide mit *N*-methylierten Aminosäuren bekannt, die oral bioverfügbar sind; ein bekanntes Beispiel ist das von der FDA und der EMA zugelassene Immunsuppressivum Ciclosporin.²²⁹ Da die Methylierung des Inhibitorrückgrats zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit führen kann, wurden auf Anregung des Verfassers von L.C. SCHMACKE im Rahmen ihrer Masterarbeit einige methylierte Derivate der beiden wirksamsten Inhibitoren der ZIKV- und WNV-Protease, **42** und **C-14**, hergestellt (Tab. 3.24). Bei allen sechs Verbindungen wurde eine im Vergleich zu den nicht-methylierten Inhibitoren geringere Hemmwirkung bestimmt. Bei den Verbindungen **C-129** bis **C-131** ist der hohe Affinitätsverlust (Faktor > 100) im Vergleich zur nicht-methylierten Verbindung **C-14** auf den ersten Blick überraschend, da zumindest bei der P5-methylierten Verbindung **C-130** und der P4-methylierten Verbindung **C-131** ein sterischer Zusammenstoß mit Enzymresten unwahrscheinlich ist (Abb. 3.22A). Eine Erklärung für den starken Affinitätsverlust wäre eine durch die Methylgruppen induzierte Konformationsänderung des Inhibitorrückgrats. In der Folge würde die Stabilisierung über die klauenartig angeordneten, intramolekularen Wasserstoffbrücken, wie sie beim Inhibitor **C-14** (vgl. Abb. 3.9, S.64) vorliegt, aufgebrochen werden. Bei den zuvor besprochenen Derivaten des Inhibitors **C-14** mit hydrophoben Seitenketten im Linkersegment (**C-44**, **C-45**, **C-99** bis **C-101**; vgl. Tab. 3.10, S.73; Tab. 3.16, S.86) kam es ebenfalls zu deutlichen Affinitätsverlusten. Beim Inhibitor **C-44** kann die reduzierte Hemmwirkung auf eine Konformationsänderung des Inhibitorrückgrats zurückgeführt werden (vgl. Abb. 3.12, S.74).

Der Affinitätsverlust der methylierten Derivate der Leitstruktur **42** lässt sich nach einem Blick auf die Komplexkristallstrukturen des Inhibitors **42** (Abb. 3.22B) erklären: Die stark reduzierte Hemmwirkung bei einer Methylierung in P ω - (**C-132**) oder P2-Position (**C-134**) lässt sich vermutlich auf die Verdrängung konformationsstabilisierender Wassermoleküle zurückführen (Abb. 3.22B). Die wasservermittelte Interaktion mit D129 bzw. die intramolekulare wasservermittelte Wechselwirkung kann nach einer Methylierung der entsprechenden Positionen nicht mehr ausgebildet werden. Der vergleichsweise geringe Affinitätsverlust der P3-methylierten Verbindung **C-133** ist vermutlich die Folge einer thermodynamisch ungünstigen Verdrängung von Wassermolekülen.

Wegen des hohen Affinitätsverlusts der Inhibitoren mit methyliertem Linkersegment und der aufwendigen Synthese²⁰⁷ der P3- und P2-methylierten Verbindungen wurde bei Optimierungen (außer beim Inhibitor **C-104**, vgl. Tab. 3.17, S.88) auf Methylierungen des Inhibitorrückgrats verzichtet.

Tabelle 3.24 Methylierte Derivate der Inhibitoren **C-14** und **42**. Die Inhibitoren **C-129** bis **C-134** wurden von L.C. SCHMACKE im Rahmen ihrer Masterarbeit hergestellt und enzymkinetisch charakterisiert.²⁰⁷



Nr.	K_i [μM]		HPLC [%B]
	ZIKV-Pro.	WNV-Pro.	
C-14	$0,00172 \pm 0,00003$	$0,0686 \pm 0,0131$	11,9
C-129 ²⁰⁷	$0,332 \pm 0,003$	$30,5 \pm 7,3$	12,0
C-130 ²⁰⁷	$0,333 \pm 0,092$	$30,6 \pm 3,5$	11,8
C-131 ²⁰⁷	$0,396 \pm 0,018$	$61,3 \pm 3,9$	11,7
42	$0,00168 \pm 0,00036$	$0,149 \pm 0,050$	17,0
C-132 ²⁰⁷	$0,0623 \pm 0,0171$	$6,13 \pm 0,33$	18,4
C-133 ²⁰⁷	$0,00637 \pm 0,00083$	$0,373 \pm 0,44$	17,7
C-134 ²⁰⁷	$0,490 \pm 0,013$	$36,9 \pm 3,3$	17,2

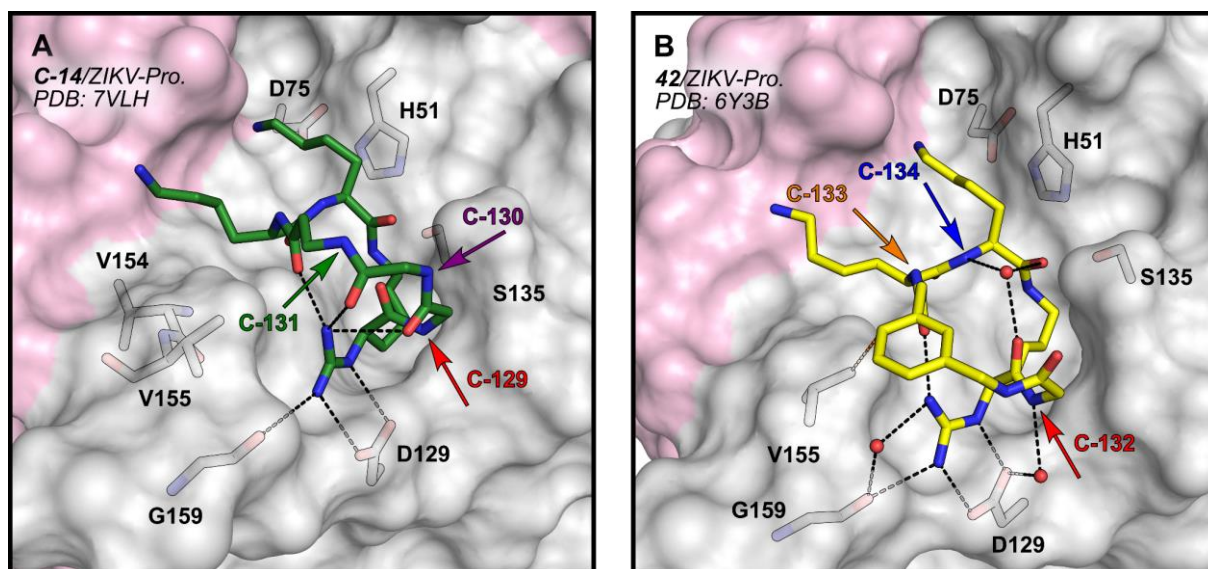
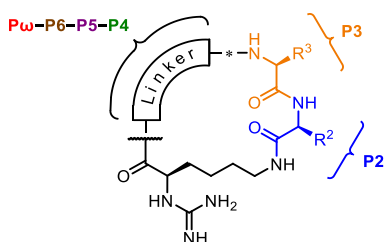


Abbildung 3.22 Komplexkristallstrukturen der Inhibitoren **C-14** (A) und **42** (B) mit der ZIKV-Protease. Die Positionen, die bei den Inhibitoren **C-129** bis **C-134** methyliert sind, sind durch Pfeile markiert.

3.5 Hemmung der Proproteinkonvertase Furin

Wie im Kapitel 1.1.3 (S.5 ff.) beschrieben, gehört die Serinprotease Furin zu den Proproteinkonvertasen und ist an der Flavivirusreifung beteiligt. Deshalb wird bei der Hemmung von Furin ein antiviraler Effekt beobachtet.^{147,220,225,228,230} Furin besitzt eine starke Präferenz für Substrate mit multibasischen Sequenzen; die bevorzugte P4-P1-Sequenz ist Arg–Xaa–Arg/Lys–Arg. Daher wurden einige Inhibitoren, vor allem diejenigen mit Argininresten, auf ihre Furinhemmung geprüft (Tab. 3.25).

Tabelle 3.25 Hemmwirkung ausgewählter Inhibitoren auf humanes Furin bei einer Inhibitorkonzentration von 100 µM (einen kompetitiven Hemmmechanismus vorausgesetzt, entsprechen 10 % Hemmung ca. einem $K_i = 40$ µM, 50 % ca. $K_i = 15$ µM, 80 % ca. $K_i = 5$ µM). Die genauen Messbedingungen sind Kapitel 5.2 (S.161) zu entnehmen.



Nr.	P ω	P6	P5	P4	P3	P2	Furinhemmung [%] ^a
42	Gly	–	–	3-Amphac	Lys	Lys	39,6 ± 1,7
C-8	D-hCha	–	–	3-Amphac	Lys	Lys	57,9 ± 1,5
C-14	Gly	–	Gly	β -Ala	Lys	Lys	35,1 ± 0,9
C-30	Gly	Gly	Gly	Arg	Lys	Lys	82,9 ± 0,5
C-31	Gly	Gly	Gly	D-Arg	Lys	Lys	84,0 ± 0,4
C-50	Gly	–	–	3-Amphac	nArg	Lys	66,7 ± 0,5
C-51	Gly	–	–	3-Amphac	Arg	Lys	66,0 ± 0,7
C-71	Gly	–	–	3-Amphac	Lys	nArg	70,8 ± 5,7
C-72	Gly	–	–	3-Amphac	Lys	Arg	50,8 ± 2,3
C-119	D-hCha	–	–	3-Amphac	Arg	Arg	$K_i = 0,362 \pm 0,011$ $IC_{50} = 0,766 \pm 0,038$ $p = 1,00 \pm 0,01$
C-120	Phe	–	2-Nal	Arg	Arg	Arg	$IC_{50} = 9,43 \pm 0,18$ $p = 1,39 \pm 0,01$
C-121	D-Phe	–	2-Nal	Arg	Arg	Arg	$IC_{50} = 5,97 \pm 0,1$ $p = 1,36 \pm 0,03$
C-122	D-hCha	–	2-Nal	Arg	Arg	Arg	$IC_{50} = 8,14 \pm 0,24$ $p = 1,61 \pm 0,06$
C-123	D-Phe	–	Phe	Arg	Arg	Arg	$IC_{50} = 5,28 \pm 0,17$ $p = 1,16 \pm 0,02$
C-124	D-hCha	–	Lys	Cha	Lys	Cha	6,2 ± 0,8
C-125	D-hCha	–	Arg	Cha	Lys	Cha	11,5 ± 1,2
C-126	D-hCha	–	Lys	Phe	Lys	Cha	11,0 ± 1,6
C-127	D-hCha	–	Arg	Phe	hArg	Cha	30,1 ± 6,8
C-128	D-hCha	–	D-Arg	Phe	hArg	Cha	49,2 ± 4,6

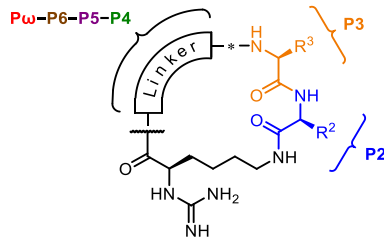
^aHemmwirkung auf Furin bei einer Inhibitorkonzentration von 100 µM, wenn nicht anders angegeben; K_i - und IC_{50} -Werte sind in [µM] angegeben; p: Hill-Koeffizient.

Die stärkste Furinhemmung wurde für den Inhibitor **C-119** bestimmt. Unter Annahme eines reversibel-kompetitiven Hemmmechanismus entspricht der bestimmte IC_{50} -Wert (766 nM) einem K_i -Wert von 362 nM. Bei Messungen des Inhibitors **C-119** mit der ZIKV- und der WNV-Protease war ein von der kompetitiven Hemmung abweichendes Verhalten festgestellt worden (vgl. Tab. 3.22, S.101). Wegen der etwa gleich hohen Hemmwirkung auf Furin und die ZIKV-Protease wäre ausgehend vom Inhibitor **C-119** die Entwicklung chimärischer Inhibitoren des Furins und des Flavivirins möglich, wie sie bereits von STEINMETZER *et al.* beschrieben wurde.¹⁴⁷ Für die argininreichen Inhibitoren **C-120** bis **C-122** wurde eine etwa zehnfach niedrigere Hemmwirkung auf Furin als für den Inhibitor **C-119** bestimmt. Jene Inhibitoren zeigen eine leichte Abweichung vom kompetitiven Hemmverhalten ($p > 1$), sodass nur IC_{50} -Werte angegeben werden können. Bei Messungen mit der ZIKV- und der WNV-Protease war ein solches Verhalten bei der Auftragung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen mit $p > 1$ ebenfalls beobachtet worden. Die möglichen Ursachen für das abweichende Hemmverhalten wurden bereits diskutiert (vgl. Kapitel 3.3.3, S.102). Des Weiteren wurden für die Inhibitoren **C-30** und **C-31** mit Arginin bzw. D-Arginin als P4-Rest relativ hohe Hemmwirkungen auf Furin bestimmt. Unter den getesteten Verbindungen sind solche ohne basischen P2-Rest (**C-124** bis **C-128**) diejenigen mit der niedrigsten Hemmwirkung auf Furin. Insgesamt spiegeln die ermittelten Hemmwerte die Substratspezifität des Furins wider. Von den argininreichen Verbindungen **C-119** bis **C-123** abgesehen, wird Flavivirin durch die getesteten Inhibitoren wesentlich effektiver gehemmt als Furin.

3.6 Selektivitätsuntersuchung mit Faktor Xa, Thrombin und Trypsin

Für einige Inhibitoren wurde auch die Selektivität für Flavivirin geprüft. Dazu wurde jeweils die Hemmwirkung dieser Inhibitoren auf den humanen Faktor Xa, bovines Thrombin und auf porcines Trypsin bei einer Inhibitorkonzentration von jeweils 100 μ M bestimmt (Tab. 3.26, S.108). Diese drei Enzyme schneiden wie Flavivirin und Furin bevorzugt hinter basischen Resten. Eine Hemmung der Gerinnungsproteasen Faktor Xa und Thrombin könnte *in vivo* zu unerwünschten Blutungen führen; eine Hemmung der Verdauungsprotease Trypsin hätte bei einer oralen Gabe Konsequenzen. Die Hemmwirkung auf Faktor Xa aller getesteten Inhibitoren liegt außer bei den kombinierten Derivaten **C-108** (23 %), **C-119** (45 %) und **C-120** (39 %) zwischen 10 % und 20 %. Die Hemmwirkung auf Thrombin liegt in einem ähnlichen Bereich, wobei für einige Inhibitoren Werte > 50 % bestimmt wurden (**C-41**, **C-103**, **C-107**, **C-108**, **C-119**, **C-120**). Trypsin wird von der Mehrzahl der untersuchten Inhibitoren am schwächsten gehemmt; für die meisten einzelmodifizierten Derivate liegt die Hemmwirkung < 10 %. Alle getesteten einzelmodifizierten Derivate zeigen eine hohe Selektivität für Flavivirin. Selbst der Inhibitor **C-41**, der eine vergleichsweise hohe Hemmwirkung auf Thrombin und Trypsin hat, hemmt die ZIKV- und die WNV-Protease zwei bzw. drei Größenordnungen effektiver.

Tabelle 3.26 Hemmwirkung ausgewählter Inhibitoren auf humanen Faktor Xa, bovines Thrombin und porcines Trypsin jeweils bei einer Inhibitorkonzentration von 100 μ M (einen kompetitiven Hemmmechanismus voraussetzend gilt für den Faktor Xa: 10 % Hemmung entsprechen ca. einem $K_i = 750 \mu$ M, 20 % ca. $K_i = 300 \mu$ M, 50 % ca. $K_i = 90 \mu$ M; Thrombin: 10 % ca. $K_i = 500 \mu$ M, 50 % ca. 50μ M, 80 % ca. $K_i = 10 \mu$ M; Trypsin: 10 % ca. $K_i = 200 \mu$ M, 50 % ca. $K_i = 20 \mu$ M, 70 % ca. $K_i = 10 \mu$ M). Die genauen Messbedingungen sind Kapitel 5.2 (S.160 f.) zu entnehmen.



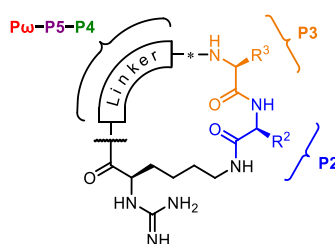
Nr.	P ω	P6	P5	P4	P3	P2	Hemmung [%] ^a		
							Faktor Xa	Thrombin	Trypsin
42	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	11,1 \pm 2,4	26,7 \pm 5,0	3,2 \pm 0,1
C-6	D-Leu	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	13,1 \pm 1,5	14,9 \pm 0,1	4,2 \pm 0,1
C-7	D-Cha	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	14,6 \pm 1,3	17,5 \pm 0,1	5,8 \pm 0,1
C-8	D-hCha	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	17,0 \pm 0,2	15,7 \pm 0,2	6,6 \pm 0,1
C-14	Gly	-	Gly	β -Ala	Lys	Lys	12,3 \pm 0,6	14,0 \pm 0,3	1,6 \pm 0,1
C-15	Gly	-	β -Ala	Gly	Lys	Lys	13,4 \pm 0,1	11,0 \pm 0,3	4,8 \pm 0,4
C-16	Gly	-	Gly	Gly	Lys	Lys	13,3 \pm 1,0	11,7 \pm 1,0	6,0 \pm 0,4
C-25	Gly	Gly	Gly	D-Phe	Lys	Lys	11,8 \pm 1,7	19,6 \pm 1,1	4,7 \pm 1,2
C-31	Gly	Gly	Gly	D-Arg	Lys	Lys	13,4 \pm 0,7	8,2 \pm 0,5	4,3 \pm 1,7
C-39	Gly	-	β -Ala	D-Cha	Lys	Lys	14,3 \pm 0,1	19,3 \pm 0,3	3,8 \pm 0,2
C-41	Gly	-	β -Ala	D-Phg	Lys	Lys	14,9 \pm 2,1	54,9 \pm 0,3	32,7 \pm 1,7
C-42	Gly	-	β -Ala	D-Phe	Lys	Lys	13,7 \pm 2,2	14,0 \pm 0,3	7,2 \pm 0,5
C-44	Gly	-	Gly	D- β^2 -hPhe	Lys	Lys	15,9 \pm 1,7	10,9 \pm 0,2	6,0 \pm 0,1
C-51	Gly	-	-	3-Amphac	Arg	Lys	14,0 \pm 0,8	14,4 \pm 0,7	7,5 \pm 1,5
C-55	Gly	-	-	3-Amphac	Cit	Lys	13,0 \pm 0,4	12,0 \pm 1,5	8,3 \pm 2,5
C-63	Gly	-	-	3-Amphac	Phe	Lys	15,3 \pm 0,4	15,7 \pm 0,5	7,6 \pm 4,0
C-72	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Arg	17,1 \pm 0,4	11,8 \pm 1,2	13,1 \pm 1,1
C-75	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Gln	18,2 \pm 1,8	9,0 \pm 0,8	3,4 \pm 0,1
C-84	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Phe	14,4 \pm 0,9	16,7 \pm 2,2	11,2 \pm 3,4
C-88	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Cha	15,7 \pm 1,6	15,5 \pm 0,4	21,6 \pm 0,5
C-97 ^b	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Arg	15,3 \pm 1,8	10,2 \pm 0,2	4,4 \pm 1,5
C-102	D-Cha	-	-	3-Amphac	Trp	Lys	10,7 \pm 1,9	25,3 \pm 1,9	8,6 \pm 0,8
C-103	D-Cha	-	-	3-Amphac	2-Nal	Lys	14,5 \pm 3,2	55,7 \pm 1,3	13,8 \pm 1,8
C-105	D-Cha	-	-	3-Amphac	Lys	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	11,7 \pm 0,7	22,4 \pm 5,0	32,0 \pm 0,6
C-107	D-Cha	-	-	3-Amphac	Phe	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	11,1 \pm 1,7	75,6 \pm 4,2	51,2 \pm 1,4
C-108	D-Cha	-	-	3-Amphac	2-Nal	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	23,1 \pm 2,3	82,6 \pm 1,0	66,8 \pm 0,3
C-113	D-Cha	-	β -Ala	D-Cha	Lys	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	12,7 \pm 0,9	16,6 \pm 1,2	70,6 \pm 2,2
C-119	D-hCha	-	-	3-Amphac	Arg	Arg	44,6 \pm 0,9	58,6 \pm 5,9	34,4 \pm 2,5
C-120	Phe	-	2-Nal	Arg	Arg	Arg	39,1 \pm 0,8	67,6 \pm 2,2	70,7 \pm 2,2
C-125	D-hCha	-	Cha	Lys	Cha	Lys	13,2 \pm 2,6	11,8 \pm 4,9	36,5 \pm 0,3

^aHemmwirkung auf Faktor Xa, Thrombin bzw. Trypsin bei einer Inhibitorkonzentration von 100 μ M; ^bohne P1-Rest, in diesem Falle ist das P ω -Glycin direkt mit dem P2-Arginin verknüpft.

3.7 Untersuchungen in cellulo

Eine Auswahl an Inhibitoren wurde von D. BENDER und R.O. MURRA (AG HILDT, Paul-Ehrlich-Institut, Langen) in Zellkultur untersucht. Zunächst wurden einzelmodifizierte Derivate der Leitstruktur **42** geprüft. Alle untersuchten Verbindungen zeigen mit CC_{50} -Werten $> 95 \mu\text{M}$ sowohl bei einer 24- als auch bei einer 48-stündigen Behandlung eine geringe Cytotoxizität (Tabelle 3.27).

Tabelle 3.27 CC_{50} -Werte einer Auswahl einzelmodifizierter Inhibitoren. Zur Bestimmung der CC_{50} -Werte wurden A549-Zellen 24 h bzw. 48 h mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen behandelt. Die relative metabolische Aktivität wurde mit dem *PrestoBlue Cell Viability Reagent* bestimmt. Kontrollexperimente wurden mit DMSO (1:4000), Triton X-100 (1 %) bzw. Cycloheximid (0,1 %) durchgeführt. Die Messwerte wurden vor Berechnung des CC_{50} -Werts auf die DMSO-Kontrolle normiert. Die Experimente und die Auswertung wurden von D. BENDER und R.O. MURRA (AG HILDT, Paul-Ehrlich-Institut, Langen) durchgeführt.



Nr.	Pw	P5	P4	P3	P2	CC_{50} [μM]	
						24 h	48 h
42	Gly	–	3-Amphac	Lys	Lys	159	181
C-6	D-Leu	–	3-Amphac	Lys	Lys	> 200	> 200
C-7	D-Cha	–	3-Amphac	Lys	Lys	> 200	> 200
C-8	D-hCha	–	3-Amphac	Lys	Lys	> 200	> 200
C-14	Gly	Gly	β -Ala	Lys	Lys	> 200	> 200
C-39	Gly	β -Ala	D-Cha	Lys	Lys	> 200	> 200
C-41	Gly	β -Ala	D-Phg	Lys	Lys	> 200	> 200
C-42	Gly	β -Ala	D-Phe	Lys	Lys	> 200	> 200
C-44	Gly	Gly	D- β^2 -hPhe	Lys	Lys	> 200	> 200
C-50	Gly	–	3-Amphac	nArg	Lys	137	161
C-55	Gly	–	3-Amphac	Cit	Lys	180	200
C-60	Gly	–	3-Amphac	Phe(3-CN)	Lys	152	143
C-62	Gly	–	3-Amphac	Trp	Lys	188	179
C-65	Gly	–	3-Amphac	2-Nal	Lys	187	157
C-67	Gly	–	3-Amphac	Cha	Lys	153	> 200
C-73	Gly	–	3-Amphac	Lys	Phe(3- CH_2NH_2)	148	169
C-76	Gly	–	3-Amphac	Lys	Cit	> 200	166
C-81	Gly	–	3-Amphac	Lys	Phe(3-CN)	134	136
C-83	Gly	–	3-Amphac	Lys	Trp	142	96,1
C-86	Gly	–	3-Amphac	Lys	2-Nal	174	159
C-88	Gly	–	3-Amphac	Lys	Cha	131	186
C-89	Gly	–	3-Amphac	Lys	Nle	154	136
C-90	Gly	–	3-Amphac	Lys	Ala	181	> 200

Die Inhibitoren **42** und **C-8** wurden zusätzlich auf ihre Stabilität unter den Assay-Bedingungen untersucht. Dazu wurden die Inhibitoren (Startkonzentration 80 μM) in DMEM jeweils mit und ohne A549-Zellen inkubiert und die Inhibitorkonzentration nach 24 h, 48 h und 72 h mittels analytischer HPLC bestimmt. In einer zuvor durchgeführten Eichmessung wurde bei beiden Inhibitoren ein linearer Zusammenhang zwischen den Integralen der HPLC-Signale und der Konzentration festgestellt (Abb. 3.23A). Es zeigte sich, dass sich die Inhibitorkonzentration im untersuchten Zeitfenster nicht signifikant ändert, die Inhibitoren also unter den Zellkulturbedingungen stabil sind (Abb. 3.23B).

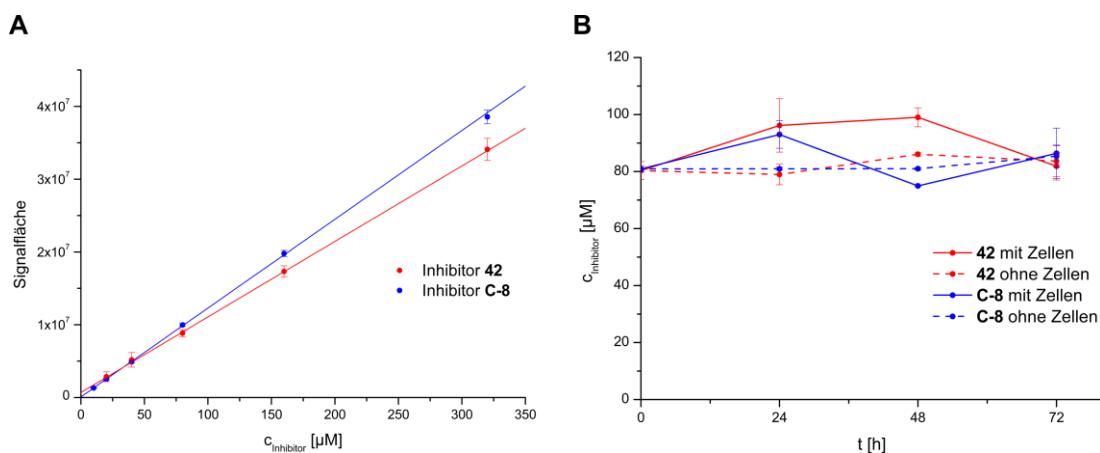


Abbildung 3.23 Stabilität der Inhibitoren **42** und **C-8** unter Zellkulturbedingungen. **(A)** Eichgeraden zur quantitativen Bestimmung der Inhibitorkonzentration aus den Flächen der HPLC-Signale: Es wurden je 75 μL des Inhibitors **42** bzw. **C-8** in DMEM (10 % FCS) auf die HPLC-Säule aufgetragen (Inhibitorkonzentrationen 10, 20, 40, 80, 160 und 320 μM , je als Triplikate; Start des HPLC-Laufs je bei 1 % B). **(B)** Konzentration der Inhibitoren **42** bzw. **C-8** nach Inkubation (0, 24, 48 und 72 h) in DMEM (10 % FCS) je mit und ohne A549-Zellen. Die Inkubation erfolgte bei 37 $^{\circ}\text{C}$ mit 5 % CO_2 und einer rel. Luftfeuchtigkeit > 90 %. Nach den genannten Zeiten wurden 300 μL des Überstands abgenommen, 15 min bei 30.000 \times g zentrifugiert und bis zur Vermessung mittels HPLC bei -80°C gelagert. Es wurden je 75 μL des Überstands auf die HPLC-Säule aufgetragen. Alle Bestimmungen wurden als technische Triplikate durchgeführt.

Des Weiteren wurde eine mögliche Proteinbindung der Inhibitoren **42** und **C-8** in einem Fluoreszenzlöschungs-Assay mit bovinem Serumalbumin (BSA) untersucht. Bei der Komplexbildung von BSA und hydrophoben Liganden wird in der Regel eine von der Ligandenkonzentration abhängige Fluoreszenzlöschung beobachtet.²³¹ Bei der Untersuchung von **42** und **C-8** mit BSA wurde auch bei hohen Inhibitorkonzentrationen keine nennenswerte Änderung des Fluoreszenzsignals beobachtet (Abb. 3.24). Entsprechend ist bei beiden Inhibitoren nicht von einer BSA-Bindung in signifikantem Ausmaß auszugehen.

Im nächsten Schritt wurde der antivirale Effekt einiger Verbindungen mit einem ZIKV-Luciferase-Reporter-Virus untersucht. Bei der Untersuchung linkermodifizierter Verbindungen (Abb. 3.25) wurde bei keinem der Derivate ein statistisch signifikanter Effekt beobachtet; lediglich die Leitstruktur **42** selbst zeigt entgegen den Ergebnissen aus der AG BARTENSCHLAGER einen leichten antiviralen Effekt; ein leichter Effekt wurde außerdem beim Inhibitor **C-8** gefunden.

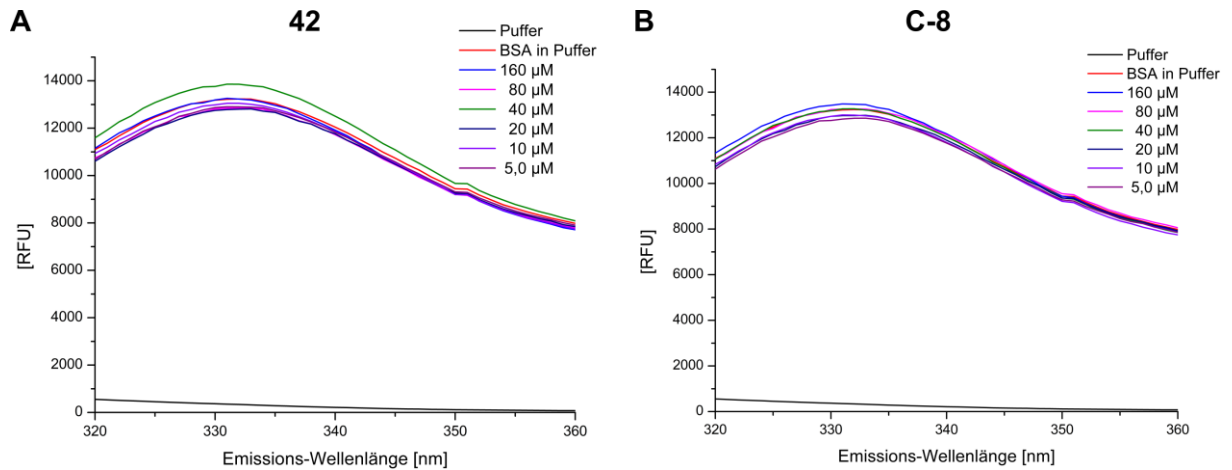


Abbildung 3.24 Untersuchung der Inhibitorbindung an bovines Serumalbumin. Fluoreszenzintensität (Anregungswellenlänge 280 nm) bei verschiedenen Emissionswellenlängen von 320 nm bis 360 nm von bovinem Serumalbumin (2 µM) in Gegenwart verschiedener Konzentrationen des Inhibitors **42** (A) bzw. **C-8** (B) jeweils in PBS-Puffer (pH 7,4). Jeder Graph ist als mittlere Kurve dreier unabhängiger Messungen gezeigt.

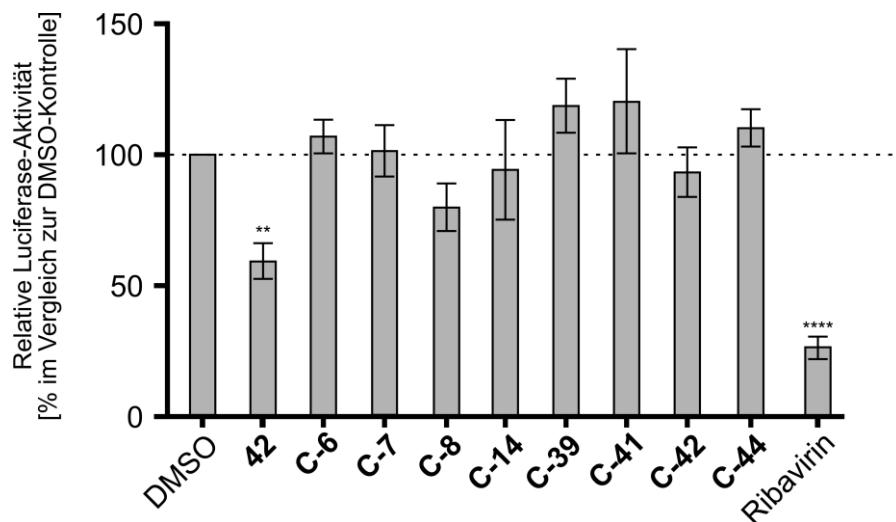


Abbildung 3.25 Untersuchung des antiviralen Effekts linkermodifizierter Inhibitoren mit einem ZIKV-Luciferase-Reporter-Virus. A549-Zellen wurden in Gegenwart eines Inhibitors (20 µM) bzw. von Ribavirin (100 µM) mit 10 Genom-Äquivalenten (GE) des ZIKV-Luciferase-Reporter-Virus infiziert. Nach 4 h und 24 h p.i. wurde jeweils die gleiche Inhibitormenge, die bei 0 h p.i. vorhanden war, erneut zugegeben. Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h p.i. bestimmt. Die Luciferase-Aktivität ist in Relation zur DMSO-Kontrolle (0,2 % V/V DMSO) als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens fünf unabhängigen Experimenten angegeben. Die statistische Signifikanz ist im Vergleich zur DMSO-Kontrolle angegeben. ** = $p > 0,01$; **** = $p > 0,0001$. Die Experimente und die Auswertung wurden von D. BENDER und R.O. MURRA (AG HILDT, Paul-Ehrlich-Institut, Langen) durchgeführt.

Deshalb wurden der Einfluss der Inhibitoren **42** und **C-8** auf die Biosynthese des viralen NS1- und des viralen E-Proteins mit Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht (Abb. 3.26, S.112). Bei Anwesenheit des Inhibitors **42** wurde kein Effekt auf die Zahl infizierter Zellen beobachtet. Bei Anwesenheit des Inhibitors **C-8** war die Zahl infizierter Zellen nach 24 Stunden etwas niedriger als bei DMSO-Kontrolle.

Dass nach 48 Stunden in Gegenwart und in Abwesenheit des Inhibitors **C-8** etwa gleich viele infizierte Zellen vorhanden sind, ist möglicherweise die Folge von Sekundärinfektionen. Dafür spricht ein vergleichsweise starkes NS1-spezifisches Signal nach 48 Stunden, wohingegen die E-spezifischen Signale weniger stark ausgeprägt sind (NS1-Proteine werden im Gegensatz zu E-Proteinen vermehrt im frühen Infektionsstadium produziert).²⁰⁶

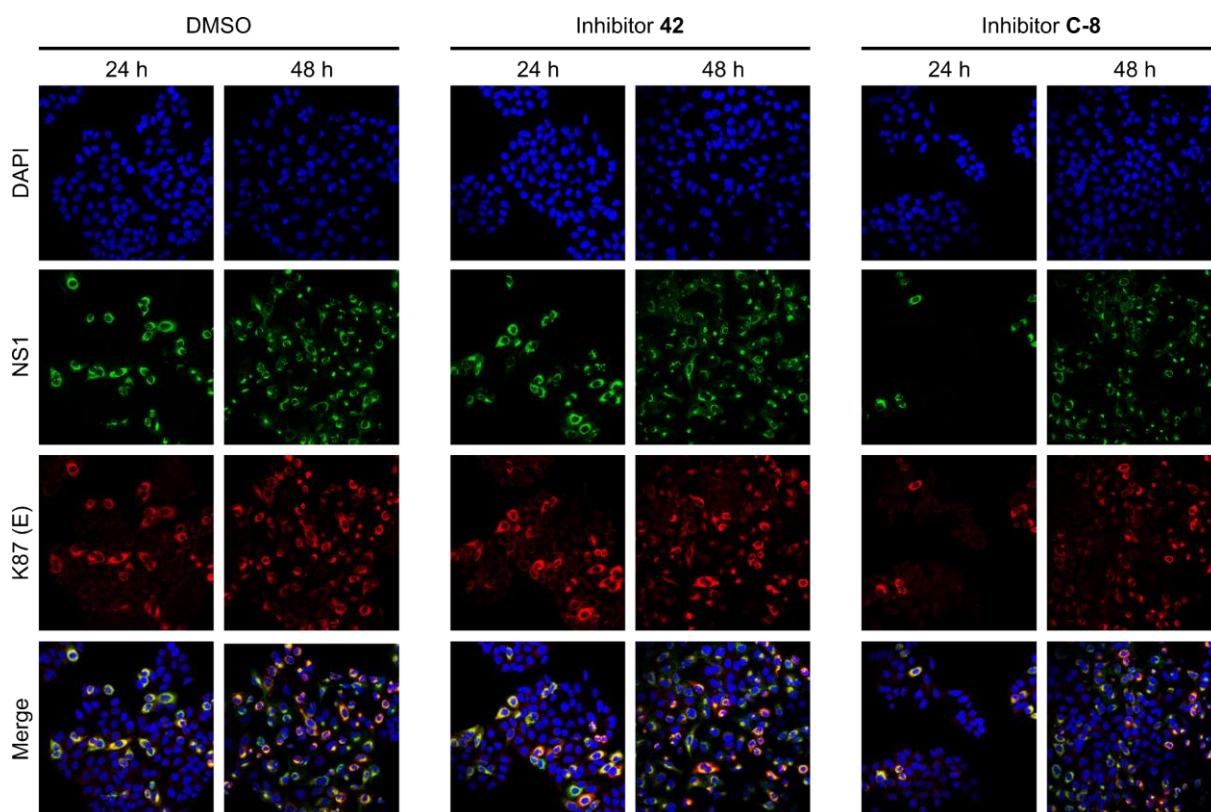


Abbildung 3.26 Einfluss der Inhibitoren **42** bzw. **C-8** auf das NS1- und das E-Protein des Zika-Virus. A549-Zellen wurden bei einer MOI von 1 mit dem Zika-Virus (French Polynesia strain H/PF/2013) in Gegenwart von 0,8 % DMSO oder 80 μ M Inhibitor (verdünnt aus 10 mM DMSO) infiziert. Die Zellen wurden 24 h bzw. 48 h p.i. mit 4 % Formaldehyd fixiert und mit NS1- bzw. E(K87)-spezifischen Antisera analysiert (grün bzw. rot). Zellkerne wurden mit DAPI visualisiert (blau). Die Bilder wurden mit einem Leica Stellaris 8-System bei 40-facher Vergrößerung aufgenommen (numerische Apertur 1,10). Die Experimente und die Auswertung wurden von D. BENDER und R.O. MURRA (AG HILDT, Paul-Ehrlich-Institut, Langen) durchgeführt.

Anders als bei den linkermodifizierten Verbindungen wurde bei mehreren P3- oder P2-modifizierten Inhibitoren in Assays mit einem ZIKV-Luciferase-Reporter-Virus ein antiviraler Effekt festgestellt (Abb. 3.27). Allerdings zeigte keine der Verbindungen einen stärkeren Effekt als die Leitstruktur **42**. Es ist bemerkenswert, dass keine Korrelation zwischen den *in vitro* bestimmten K_i -Werten und der Hemmwirkung in Zellkultur besteht: Die Inhibitoren **C-50** (P3-nArg) und **C-73** (P2-Phe(3-CH₂NH₂)) sind *in vitro* ähnlich potente Flavivirininhibitoren wie die Leitstruktur **42**, zeigen in Zellkultur aber keine signifikante Wirkung. Bei den 3-Cyanophenylalanin-Derivaten **C-60** (P3) und **C-81** (P2), den 2-Naphthylalanin-Derivaten **C-65** (P3) und **C-86** (P2) sowie bei den Cyclohexylalanin-Derivaten **C-67** (P3) und **C-88** (P2) ist die antivirale Wirksamkeit in Zellkultur jeweils beim P2-Derivat stärker

ausgeprägt, obwohl deren Hemmwirkung auf die ZIKV-Protease *in vitro* je um einen Faktor von etwa 1000 niedriger ist als beim zugehörigen P3-Derivat. Von den Citrullin-Inhibitoren **C-55** (P3) und **C-76** (P2) zeigt dagegen nur das P3-Derivat einen signifikanten Effekt *in cellulo*. Aus den Experimenten geht hervor, dass sich hydrophobe Aminosäuren prinzipiell als Lysin-Ersatz eignen und ihr Einbau in der P2-Position besser toleriert wird als in der P3-Position.

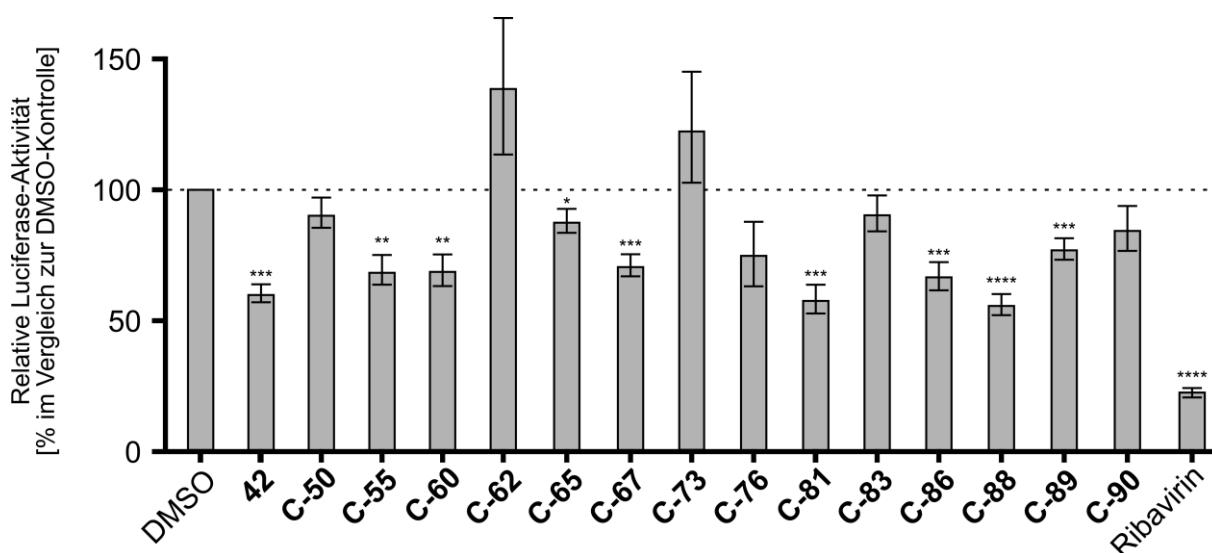


Abbildung 3.27 Untersuchung des antiviralen Effekts P3- und P2-modifizierter Inhibitoren mit einem ZIKV-Luciferase-Reporter-Virus. A549-Zellen wurden in Gegenwart eines Inhibitors (40 μM) bzw. von Ribavirin (100 μM) mit 10 Genom-Äquivalenten (GE) des ZIKV-Luciferase-Reporter-Virus infiziert. Nach 4 h und 24 h p.i. wurde jeweils die gleiche Inhibitormenge, die bei 0 h p.i. vorhanden war, erneut zugegeben. Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h p.i. bestimmt. Die Luciferase-Aktivität ist in Relation zur DMSO-Kontrolle (0,2 % V/V DMSO) als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten angegeben. Die statistische Signifikanz ist im Vergleich zur DMSO-Kontrolle angegeben. * = $p > 0,05$; ** = $p > 0,01$; *** = $p > 0,001$; **** = $p > 0,0001$. Die Experimente und die Auswertung wurden von D. BENDER und R.O. MURRA (AG HILDT, Paul-Ehrlich-Institut, Langen) durchgeführt.

Die Zellkulturexperimente mit den lipophil-kombinierten Derivaten **C-102** bis **C-118** standen zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit noch aus.

Von sechs potentiell zellpenetrierenden Inhibitoren wurden die Cytotoxizität und die antivirale Wirkung untersucht (Abb. 3.28, S.114; Abb. 3.29, S.115). Bis zu einer Inhibitorkonzentration von 40 μM wurde bei keiner der untersuchten Verbindungen ein signifikanter Effekt auf die Zellviabilität festgestellt. Bei den Inhibitoren mit alternierend hydrophoben und basischen Resten (**C-124**, **C-125** und **C-126**) wurden auch höhere Inhibitorkonzentrationen toleriert. Der antivirale Effekt aller getesteten potentiell zellpenetrierenden Inhibitoren außer **C-120** ist im Luciferase-Reporter-Assay höher als der der Leitstruktur **42**. Besonders ausgeprägt ist der antivirale Effekt bei den Inhibitoren **C-122** und **C-125** (die Strukturen sind in Abb. 3.30, S.115, gezeigt), die bei einer Konzentration von 40 μM die Virusvermehrung ähnlich stark hemmen wie 100 μM Ribavirin.

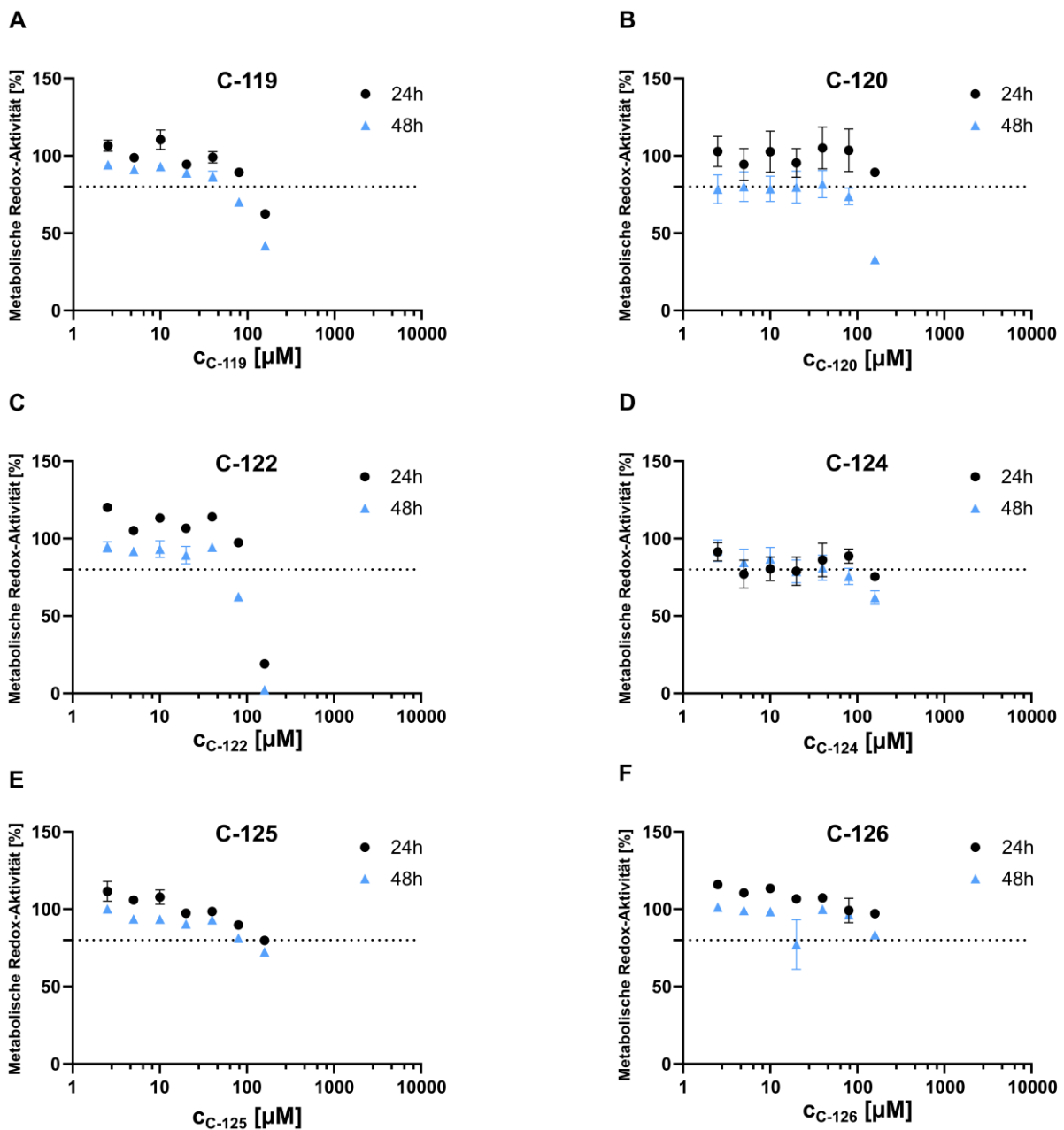


Abbildung 3.28 Effekt einiger potentiell zellpenetrierender Inhibitoren auf die metabolische Aktivität. A549-Zellen wurden 24 h bzw. 48 h mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen behandelt. Die relative metabolische Aktivität wurde mit dem *PrestoBlue Cell Viability Reagent* bestimmt. Kontrolleexperimente wurden mit DMSO (1:4000), Triton X-100 (1 %) bzw. Cycloheximid (0,1 %) durchgeführt. Die Messwerte wurden auf die DMSO-Kontrolle normiert. Die Experimente und die Auswertung wurden von D. BENDER und R.O. MURRA (AG HILDT, Paul-Ehrlich-Institut, Langen) durchgeführt.

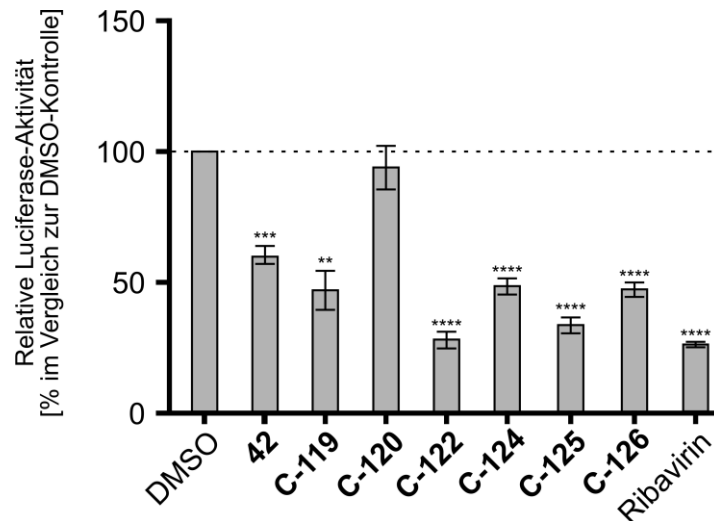


Abbildung 3.29 Untersuchung des antiviralen Effekts zellpenetrierender Inhibitoren mit einem ZIKV-Luciferase-Reporter-Virus. A549-Zellen wurden in Gegenwart eines Inhibitors (40 μM) bzw. von Ribavirin (100 μM) mit 10 Genom-Äquivalenten (GE) des ZIKV-Luciferase-Reporter-Virus infiziert. Nach 4 h und 24 h p.i. wurde jeweils die gleiche Inhibitormenge, die bei 0 h p.i. vorhanden war, erneut zugegeben. Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h p.i. bestimmt. Die Luciferase-Aktivität ist in Relation zur DMSO-Kontrolle (0,2 % V/V DMSO) als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten angegeben. Die statistische Signifikanz ist im Vergleich zur DMSO-Kontrolle angegeben. ** = $p > 0,01$; *** = $p > 0,001$; **** = $p > 0,0001$. Die Experimente und die Auswertung wurden von D. BENDER und R.O. MURRA (AG HILDT, Paul-Ehrlich-Institut, Langen) durchgeführt.

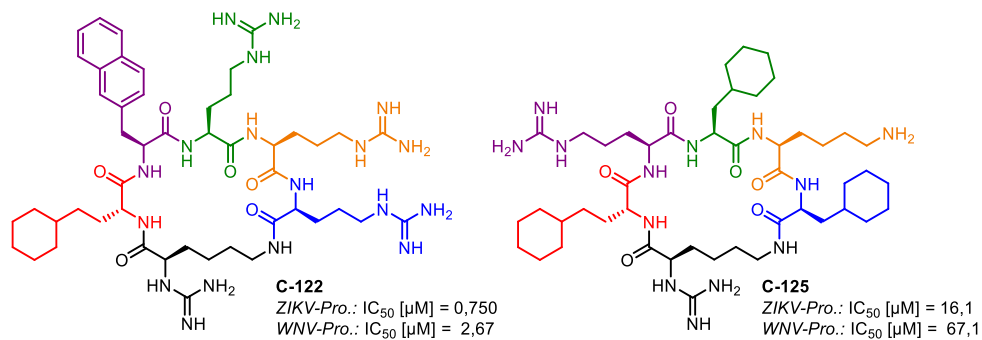


Abbildung 3.30 Strukturen der Inhibitoren **C-122** und **C-125**. Die beiden Inhibitoren zeigen unter den in dieser Arbeit vorgestellten Verbindungen die stärkste Hemmwirkung auf die ZIKV-Vermehrung *in cellulo*.

3.8 Boroleucin-basierte Inhibitoren

Einige besonders wirksame peptidische Flavivirininhibitoren binden reversibel-kovalent an das S135 der katalytischen Triade (vgl. Kap. 1.2.2.1, S.15 ff.). Um eine kovalente Modifizierung zu erreichen, tragen diese Inhibitoren eine reaktive Aldehyd-, Trifluormethylketon- oder Boronsäuregruppe am C-Terminus. Der C-terminale P1-Rest ist bei den bisher bekannten Inhibitoren immer ein Arginin-Derivat, also zum Beispiel Arginal, Boroarginin oder ein Arginin-Mimetikum wie beim Inhibitor **7** (vgl. Abb. 1.8, S.19). Mit Bortezomib (**60**) und Ixazomib (**61**) sind zwei Proteasehemmstoffe mit C-terminaler Boronsäurefunktion durch die EMA zugelassen. Beide sind Inhibitoren des Proteasoms (einer Threoninprotease) und werden zur Behandlung des Multiplen Myeloms eingesetzt.²³²

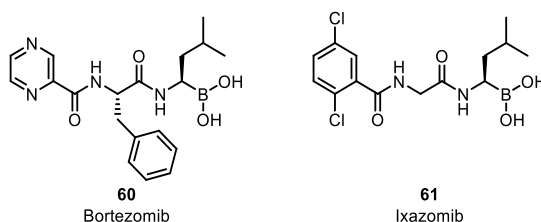


Abbildung 3.31 Die Proteasominhibitoren Bortezomib und Ixazomib.

In allen Komplexkristallstrukturen cyclischer Inhibitoren, die in dieser Arbeit vorgestellt wurden, ist die Distanz zwischen dem C_ε des guanylierten D-Lysins in P1-Position und der Hydroxygruppe des S135 sehr kurz; bei der Leitstruktur **42** beträgt diese Distanz 3,1 Å. Dies wurde zum Anlass genommen, ausgehend von der Leitstruktur **42** lineare Inhibitoren zu entwickeln, die über eine C-terminale, reaktive Gruppe kovalent an das S135 binden können (Abb. 3.32). Dafür sollte die Alkylkette des P1-Rests formal geschnitten und ein Boroleucin als P1-Rest eingebaut werden. Da die Adressierung des D129 essentiell für eine hohe Hemmwirkung ist, sollte diese über die Guanylierung des N-Terminus realisiert werden. Die Verwendung von Boroleucin ist aus mehreren Gründen sinnvoll: Erstens sind mehrere potente Inhibitoren des Flavivirins mit C-terminaler Boronsäurefunktionalität bekannt (vgl. Tab. 1.2, S.16), was grundsätzlich die Verwendung einer Aminoboronsäure als P1-Rest rechtfertigt. Zweitens liegen am Boden der S1-Tasche des Flavivirins die Seitenketten des Y150 und des Y161; es besteht also eine hydrophobe Umgebung. Deshalb sollte die hydrophobe Seitenkette des Boroleucins zur Bindung in den S1-Bereich geeignet sein. Drittens ist die Verwendung von Boroleucin auch aus praktischen Gesichtspunkten günstig. Im Unterschied zum bereits in Flavivirininhibitoren^{114,134-136,139} eingebauten Boroarginin, das nur aufwendig herstellbar ist, ist Boroleucin als Baustein von Bortezomib und Ixazomib auch in größeren Mengen kommerziell erhältlich.

Die auf Basis der Leitstruktur **42** hergestellten Inhibitoren **B-1** bis **B-8** mit Boroleucin als P1-Rest sind in Tabelle 3.28 (S.118) gezeigt. Für das der Leitstruktur ähnlichste Derivat **B-1** wurden um den Faktor 20 niedrigere Affinitäten zur ZIKV- und zur WNV-Protease ermittelt. Dennoch sprechen diese

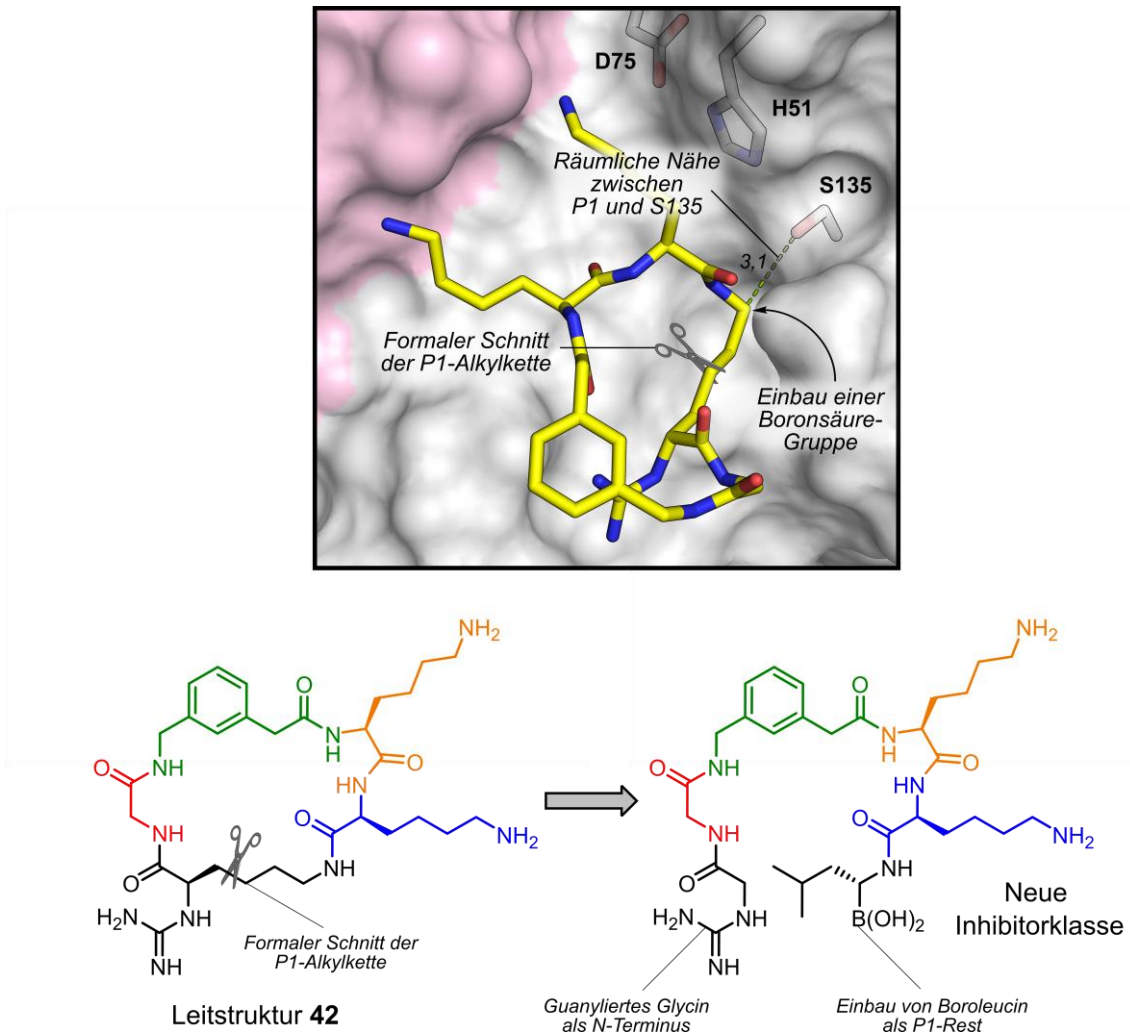
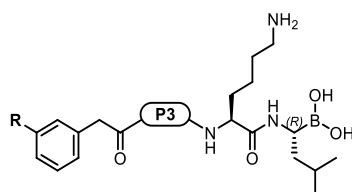


Abbildung 3.32 Die Entwicklung linearer, kovalenter Flavirininhibitoren sollte durch einen formalen Schnitt der P1-Alkylkette erfolgen. Der N-Terminus sollte zur Adressierung des D129 in der S1-Tasche guanyliert werden, am C-Terminus sollte Boroleucin zur Adressierung des S135 eingebaut werden.

Hemmwerte im zweistelligen nanomolaren bzw. einstelligen mikromolaren Bereich dafür, dass entweder die Adressierung des D129 über die N-terminale Guanidinogruppe oder die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen der Boronsäurefunktion und S135 (oder möglicherweise beides) gelang. Beim Inhibitor **B-2**, dessen N-terminales Glycin nicht guanyliert wurde, wurde im Vergleich zu **B-1** eine zehn- bzw. vierfach reduzierte Hemmwirkung festgestellt. Dies ist insofern erstaunlich, als dass die Leitstruktur **42** im Vergleich zu ihrem nicht guanylierten Analogon **C-92** um den Faktor 13.000 bzw. 650 affiner ist (vgl. Tab. 3.14, S.85). Der vergleichsweise geringe Affinitätsunterschied zwischen **B-1** und **B-2** legt nahe, dass die Seitenkette des D129 nicht durch den jeweiligen N-Terminus adressiert wird. Wird die Linker-Sequenz zwischen dem N-terminalen Guanidin und dem P3-Rest im Vergleich zu **B-1** um eine Aminosäure verkürzt (Inhibitoren **B-3** bis **B-5**), so erhöht sich die Affinität zur ZIKV-Protease leicht, wohingegen sich die Affinität zu WNV-Protease leicht erniedrigt. Der Inhibitor **B-5** ist nicht nur innerhalb der hier vorgestellten Serie derjenige mit dem niedrigsten K_i -Wert, sondern der affinste bisher

Tabelle 3.28 Lineare Inhibitoren des Flavivirins mit Boroleucin als P1-Rest.

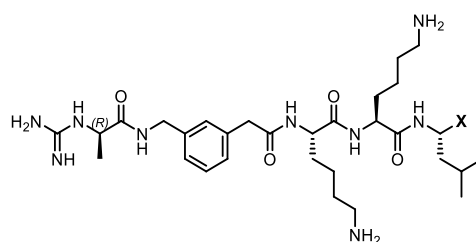
Nr.	R	P3	K_i [μM]		HPLC [%B]
			ZIKV-Pro.	WNV-Pro.	
B-1		Lys	0,0315 \pm 0,0047	2,73 \pm 0,20	19,7
B-2		Lys	0,294 \pm 0,027	11,7 \pm 0,4	20,6
B-3^a		Lys	0,0114 \pm 0,0012	4,01 \pm 0,23	19,8
B-4^b		Lys	0,0114 \pm 0,0006	3,63 \pm 0,11	20,8
B-5^c		Lys	0,00796 \pm 0,00022	3,82 \pm 0,12	20,7
B-6		Lys	0,0184 \pm 0,0040	0,838 \pm 0,021	20,9
B-7	H	Lys	0,845 \pm 0,236	5,44 \pm 0,27	17,6
B-8		Arg	0,0508 \pm 0,0055	3,67 \pm 0,23	22,7

^aDENV2-Pro.: $K_i = 6,00 \pm 0,44 \mu\text{M}$; ^bDENV2-Pro.: $K_i = 4,94 \pm 0,07 \mu\text{M}$; ^cDENV2-Pro.: $K_i = 3,93 \pm 0,22 \mu\text{M}$.

bekanntere reversibel-kovalente Inhibitor der ZIKV-Protease überhaupt. Beim Inhibitor **B-6** wurde ein guanyliertes β -Alanin als *N*-terminaler Rest eingebaut, was bei der ZIKV-Protease im Vergleich zur Verbindung **B-5** zu einem leichten Affinitätsverlust, bei der WNV-Protease hingegen zu einem Affinitätsgewinn um den Faktor 5 führte. Der Inhibitor **B-7**, der einen unsubstituierten *N*-terminalen Phenylacetyl-Rest besitzt und damit deutlich kürzer als die übrigen Inhibitoren ist, hemmt die ZIKV-Protease etwa 100-fach weniger effektiv als **B-5**. Bei der WNV-Protease führt diese Verkürzung hingegen kaum zu einer Veränderung der Hemmwirkung; der K_i -Wert von **B-7** unterscheidet sich nur geringfügig von denen der Inhibitoren **B-1** bis **B-5**. Zuletzt wurde die Verbindung **B-8** mit dem gleichen *N*-terminalen Segment wie **B-5**, aber mit Arginin statt Lysin als P3-Rest, synthetisiert. Die Hemmwirkung auf die ZIKV-Protease ist bei diesem Inhibitor etwa sechsfach niedriger als bei dessen Lysin-Analogon **B-5**; die Hemmwirkung auf die WNV-Protease ändert sich durch den Lysin-Arginin-Austausch nicht.

Um die Vermutung zu bestätigen, dass die C-terminale Boronsäurefunktion einen entscheidenden Beitrag zur Hemmwirkung leistet, wurden die linearen Referenzinhibitoren **L-4**, **L-5** und **L-6** synthetisiert (Tab. 3.29). Deren Sequenz stimmt vom N-Terminus bis zum P2-Rest mit der des Inhibitors **B-5** überein, als P1-Rest enthalten jene jedoch Leucin, Leucinamid bzw. Isopentylamin anstelle des Boroleucins. Alle drei Referenzinhibitoren zeigen eine um mindestens den Faktor 10 verringerte Hemmwirkung auf die ZIKV- und auf die WNV-Protease, in den meisten Fällen ist der Unterschied noch deutlich größer. Die niedrigste Affinität zu beiden Proteasen zeigt das Derivat mit Carbonsäurefunktion (**L-4**). Das Carbonsäureamid-Derivat **L-5** hemmt die ZIKV-Protease mehr als hundertfach stärker und die WNV-Protease vierfach stärker als **L-4**. Mit C-terminalem Isopentylamin (**L-6**) liegt die Hemmwirkung auf die ZIKV-Protease wieder niedriger als beim Leucinamid-Derivat **L-5**; die WNV-Protease hingegen wird durch **L-6** etwas effektiver gehemmt als durch **L-5**. Eine ähnliche Tendenz bezüglich der ZIKV-Proteasehemmung wurde bei den linearen Derivaten der Leitstruktur **42** beobachtet (**54**, **L-1** bis **L-3**; vgl. Tab. 3.4, S.54).

Tabelle 3.29 Analoga des Inhibitors **B-5** ohne Boronsäurefunktion.



Nr.	X	K_i [μM]		HPLC [%B]
		ZIKV-Pro.	WNV-Pro.	
B-5	$B(OH)_2$	$0,00796 \pm 0,00022$	$3,82 \pm 0,12$	20,7
L-4	CO_2H	$37,1 \pm 5$	630 ± 227	18,4
L-5	$CONH_2$	$0,275 \pm 0,007$	163 ± 3	17,7
L-6	H	$1,64 \pm 0,07$	$57,2 \pm 1,1$	17,2

Vom Inhibitor **B-5**, der unter den Boroleucin-basierten Inhibitoren die ZIKV-Protease am effektivsten hemmt, wurde eine Kristallstruktur im Komplex mit der ZIKV-Protease bestimmt (Abb. 3.33A, S.120). Die Elektronendichte des Inhibitors ist in dieser Kristallstruktur nur für das P2-P1-Segment vollständig definiert; dagegen fehlt die Dichte der endständigen Aminomethylgruppe der P3-Seitenkette und des N-terminalen Segments bis zum Aromaten des P4-Rests. Es ist auffällig, dass anders als bei der Mehrzahl der Inhibitor-Flavivirin-Komplexe der Inhibitor **B-5** eine kanonische Konformation (mit alternierend ausgerichteten Seitenketten im P3-P1-Segment) einnimmt. Die übrigen in dieser Arbeit vorgestellten linearen Inhibitoren **54**, **L-2** und **L-3** (vgl. Abb. 3.7, S.55) nehmen eine hufeisenförmige Konformation ein. Dies bestätigt die bereits in der Einführung diskutierte Beobachtung, dass die treibende Kraft, die zur Einnahme der hufeisenförmigen Konformation führt, die Ausbildung einer

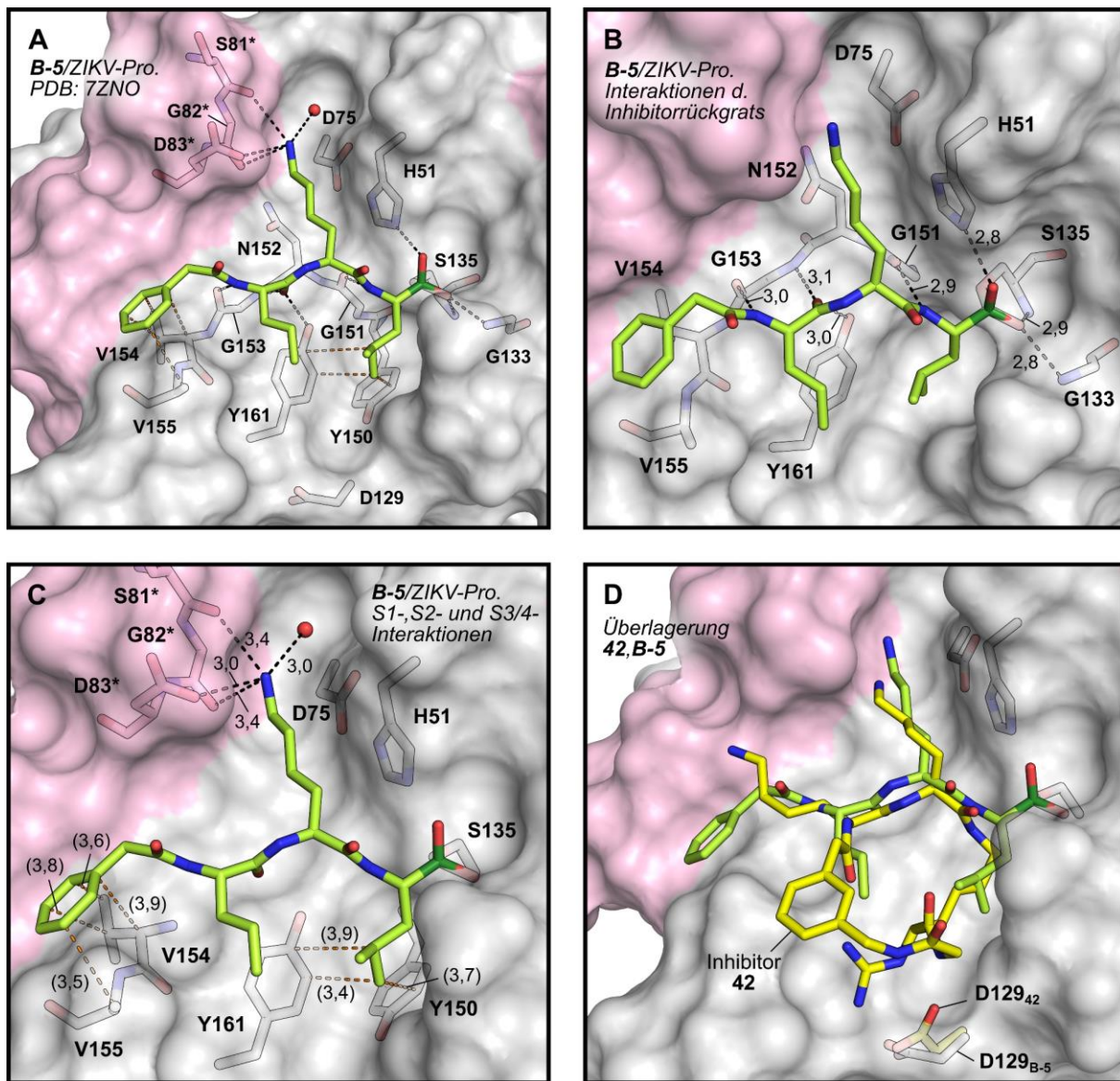


Abbildung 3.33 Struktur des Inhibitors **B-5** im Komplex mit der ZIKV-Protease. Es sind nur diejenigen Teile des Inhibitors gezeigt, für die eine ausreichend definierte Elektronendichte erhalten wurde. (A) Übersicht. (B) β -Faltblattartige Kontakte zwischen dem Inhibitorrückgrat und der Protease. (C) Interaktionen in der S1- und S2-Tasche sowie im S3/4-Bereich. (D) Überlagerung mit der Leitstruktur **42**; die Enzymoberfläche ist dem **B-5**/ZIKV-Protease-Komplex (PDB: 7ZNO) entnommen. Röntgenstrukturanalyse durch S. HUBER (AG STEINMETZER).

polaren Wechselwirkung zwischen der P1-Guanidinogruppe und dem P4-Carbonylsauerstoff ist (vgl. Kap. 1.2.2.1, S.26 ff.); diese polare Wechselwirkung kann im Falle des Boroleucin-Derivats **B-5** wegen der fehlenden Guanidinogruppe nicht existieren. Die vorausgesagte, kovalente Bindung zwischen dem Boratom des P1-Rests und dem Sauerstoffatom der S135-Seitenkette wurde in der Komplexkristallstruktur gefunden (Abb. 3.33B). Die dadurch entstandene, tetraedrische Boronatgruppe wird durch polare Wechselwirkungen mit H51 sowie mit den NH-Gruppen des G133 und des S135 im Oxyanionloch stabilisiert. Das Inhibitorrückgrat bildet über Wechselwirkungen zu G151 und G153 eine β -faltblattartige Struktur aus, wie sie bereits für Spaltprodukte cyclischer Inhibitoren im Komplex mit

der ZIKV-Protease beschrieben wurde (PDB: 6JPW und 7DOC).^{112,233} Zur Hemmwirkung tragen des Weiteren Van-der-Waals-Kontakte zwischen der Seitenkette des Boroleucins und den Seitenketten des Y150 und des Y161 sowie Van-der-Waals-Kontakte zwischen dem Aromaten des P4-Rests und V154 und V155 bei (Abb. 3.33C). Die Wechselwirkungen der P2-Seitenkette unterscheiden sich leicht von denen der Leitstruktur **42** in dieser Position. In beiden Fällen werden Wasserstoffbrücken zwischen der P2-Aminogruppe und G82*, D83* sowie einem Wassermolekül beobachtet. Bei der Leitstruktur **42** und den meisten in dieser Arbeit vorgestellten Strukturen ist ebenfalls eine Wechselwirkung zur Seitenkette des N152 vorhanden. Diese bildet der Inhibitor **B-5** im Komplex mit der ZIKV-Protease nicht; stattdessen ist eine, wenn auch relativ schwache (Länge von 3,4 Å), Interaktion mit dem Carbonylsauerstoff des S81* vorhanden. In der Überlagerung der Inhibitoren **42** und **B-5** (Abb. 3.33D) ist die unterschiedliche Positionierung der P2-Reste, die zur Ausbildung der verschiedenen Wechselwirkungen führt, deutlich zu erkennen. Zu erkennen ist ebenfalls eine leicht verschobene Positionierung des Inhibitorrückgrats im P2-P1-Segment, die ein Resultat der kovalenten Bindung des P1-Rests an das S135 ist. Besonders augenfällig sind die unterschiedlichen Positionen der P3-Reste. Es sei noch angemerkt, dass beim Inhibitor **B-5** trotz der fehlenden Elektronendichte am Ende der P3-Seitenkette eine Wechselwirkung zwischen der P3-Aminogruppe und D129 ausgeschlossen werden kann. Grund dafür ist erstens der große Abstand (6,7 Å) zwischen dem C δ des P3-Lysins (dem letzten in der Elektronendichte definierten Atom) und dem näheren der beiden Carboxylatsauerstoffe des D129 und zweitens die für eine Wechselwirkung ungünstige Ausrichtung der D129-Seitenkette.

Für die von KLEIN *et al.* beschriebenen kovalenten Inhibitoren mit basischer P1-Seitenkette, wie Inhibitor **6** (vgl. Abb. 1.8, S.19), wurde eine Hemmwirkung auf Trypsin beschrieben, während die Hemmwirkung auf Thrombin sehr gering war. Sowohl Trypsin als auch Thrombin spalten Substrate nur C-terminal basischer Reste. Für den Inhibitor **B-5** wurde daher erwartungsgemäß eine sehr schwache Hemmwirkung auf die beiden Proteasen beobachtet (Tab. 3.30). Die Hemmwirkung von **B-5** auf die humane neutrophile Elastase, die bevorzugt nach Alanin, Valin oder Threonin schneidet, ist etwas stärker als auf Trypsin und Thrombin, aber dennoch um mehr als einen Faktor 100 geringer als auf die ZIKV-Protease. Für Chymotrypsin, das aromatische Reste oder Leucin in P1-Position bevorzugt, liegt die Selektivität noch bei einem Faktor von ca. 10. Der Inhibitor **B-5** ist dem demzufolge ein selektiver Hemmstoff der ZIKV-Protease. Die WNV-Protease wird hingegen nicht selektiv gehemmt.

Tabelle 3.30 Hemmung von bovinem Thrombin, porcinem Trypsin, humaner neutrophiler Elastase und bovinem α -Chymotrypsin durch den Inhibitor **B-5**.

Enzym	Hemmung [% Hemmung] bzw. K_i
Thrombin	56 % \pm 14 % (100 μ M B-5)
Trypsin	38 % \pm 1 % (100 μ M B-5)
Elastase	$K_i = 1,07 \mu\text{M} \pm 0,04 \mu\text{M}$
Chymotrypsin	$K_i = 0,107 \mu\text{M} \pm 0,008 \mu\text{M}$

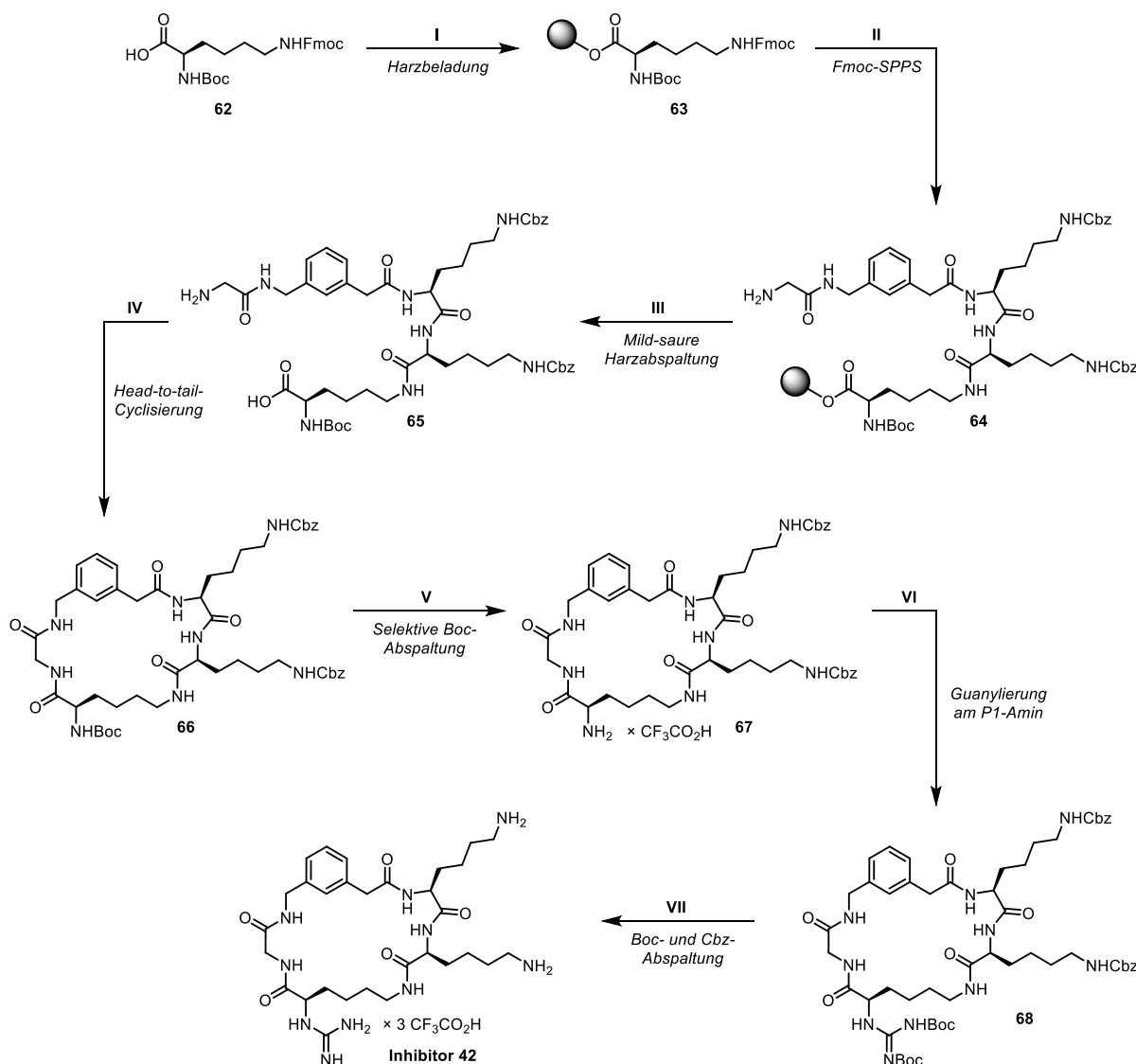
3.9 Synthese der Inhibitoren

3.9.1 Synthese der Leitstruktur **42**

Als Basis für die Synthese aller im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Inhibitoren diente die in der AG STEINMETZER entwickelte Strategie zur Herstellung des Inhibitors **42**, die hier kurz erläutert werden soll (Schema 3.1).¹²² Erster Schritt der Synthese ist die Beladung eines 2-Chlorotriethylchlorid-Harzes (2-CTC-Harz) mit Boc-D-Lys(Fmoc)-OH (**62**), dem Präkursor des P1-Rests. Nach der Fmoc-Abspaltung vom beladenen Harz **63** wurden sukzessive der P2- und P3-Rest als Fmoc-Lys(Cbz)-OH, der P4-Rest als Fmoc-3-Amphac-OH und schließlich der P ω -Rest als Fmoc-Gly-OH eingeführt, wobei nach jedem Kupplungsschritt die entsprechende Fmoc-Schutzgruppe durch Behandlung mit 20 % Piperidin in DMF (V/V) abgespalten wurde. Die Kupplungen erfolgten in DMF mit HATU als Kupplungsreagenz und DIPEA als Hilfsbase. Das auf diese Weise erhaltene harzgebundene, lineare Peptid **64** wurde unter mild-sauren Bedingungen mit 1 % TFA in DCM (V/V) abgespalten. Da unter diesen Bedingungen sowohl Boc- als auch Cbz-Schutzgruppen stabil sind, wurde so das Boc/Cbz-geschützte Peptid **65** erhalten. Dessen Reinheit war ausreichend hoch, um die folgende *head-to-tail*-Cyclisierung mit HATU und DIPEA in DMF durchzuführen. Um intermolekulare Oligomerisierungen zu unterdrücken, wurde die Cyclisierung in stark verdünnter Lösung (Peptidkonzentration ca. 2 mM) durchgeführt.²³⁴ Das cyclisierte Peptid **66** wurde anschließend mit 4 M HCl in 1,4-Dioxan behandelt, wodurch selektiv die Boc-Gruppe abgespalten wurde. Das cyclische Peptid **67** mit freier P1-Aminogruppe wurde nach einem Reinigungsschritt zum zweifach Boc-geschützten Guanidin **68** umgesetzt; zur Überführung des P1-Amins in ein Guanidin wurde das Reagenz *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin eingesetzt.²³⁵ Im letzten Schritt wurden die Boc-Schutzgruppen des P1-Rests und die Cbz-Schutzgruppen des P2- und des P3-Rests mit 32 % HBr in AcOH abgespalten. Nach Reinigung mittels präparativer HPLC wurde der Inhibitor **42** als TFA-Salz isoliert (TFA war Teil des Eluenten der präparativen HPLC). Die Ausbeute dieser Synthese betrug 16 % über alle Stufen. Sämtliche Schritte wurden bei Umgebungstemperatur und ohne Schutzgasbedingungen durchgeführt. Die Erstsynthese des Inhibitors **42** wurde von D. ROGGE (AG STEINMETZER) durchgeführt.

In Abbildung 3.34 (S.124) sind die HPLC-Chromatogramme der Intermediate **65**, **66** und **67** sowie des finalen Inhibitors **42** gezeigt. Die deutliche Verschiebung des HPLC-Signals von Stufe zu Stufe erlaubt ein einfaches Überprüfen des Reaktionsumsatzes. Bei der Synthese analoger Zwischenstufen der übrigen cyclischen Inhibitoren wurden vergleichbare Verschiebungen der HPLC-Retentionszeiten beobachtet, also eine Verschiebung um ungefähr +8 % B bei der *head-to-tail*-Cyclisierung und eine Verschiebung um ungefähr -10 % B nach Abspaltung der Boc-Gruppe. Bei der Umwandlung der Aminzwischenstufe **67** zum finalen Inhibitor **42** wurde eine Verschiebung des HPLC-Signals um ungefähr -30 % B beobachtet, die im Wesentlichen auf die Abspaltung der zwei Cbz-Schutzgruppen zurückzuführen ist. In der Regel wurde in dieser Arbeit eine Verschiebung um etwa -15 % B pro

abgespaltener Cbz-Gruppe beobachtet. Bei der Charakterisierung der zweifach Boc-geschützten Intermediate (wie **68**) wurde unter HPLC-Bedingungen (d.h. gelöst in 0,1 % TFA in Wasser/Acetonitril) in der Regel die Abspaltung einer oder mehrerer Boc-Gruppen beobachtet. Daher wurde der Reaktionsfortschritt bei der Umsetzung des Amin-Intermediats **67** zum geschützten Guanidin **68** und analoger Stufen entweder mittels HPLC anhand der Abnahme der Eduktsignalgröße abgeschätzt oder mittels Massenspektrometrie verfolgt.



Schema 3.1 Synthese der Leitstruktur **42**. (I) 1,0 Äq. 2-CTC-Harz, 4,0 Äq. DIPEA, DCM, 2 h (II) Sukzessive Kupplung von zweimal Fmoc-Lys(Cbz)-OH, einmal Fmoc-3-Amphac-OH und einmal Fmoc-Gly-OH. Die Kupplungen erfolgten jeweils mit 3,0 Äq. Aminosäure in Gegenwart von 3,0 Äq. HATU und 6,0 Äq. DIPEA in DMF. Nach der Harzbeladung und nach jeder Kupplung wurde Fmoc durch zweimalige Behandlung mit 20 % Piperidin in DMF (V/V) abgespalten (5 min und 15 min). (III) 1 % TFA in DCM (V/V), 4 × 30 min, Neutralisierung der isolierten Abspaltlösung nach jeweils 30 min mit DIPEA. (IV) 3,0 Äq. HATU, 6,0 Äq. DIPEA, DMF, 2 h (Peptidkonzentration ca. 2 mM). (V) 4 M HCl in 1,4-Dioxan, Fällung aus Et₂O, präparative HPLC. (VI) 4,5 Äq. *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin, 7,5 Äq. DIPEA, DMF, 48 h. (VII) 32 % HBr in AcOH, 2 h, Fällung aus Et₂O, präparative HPLC. Die Ausbeute über alle Stufe betrug 16 %.

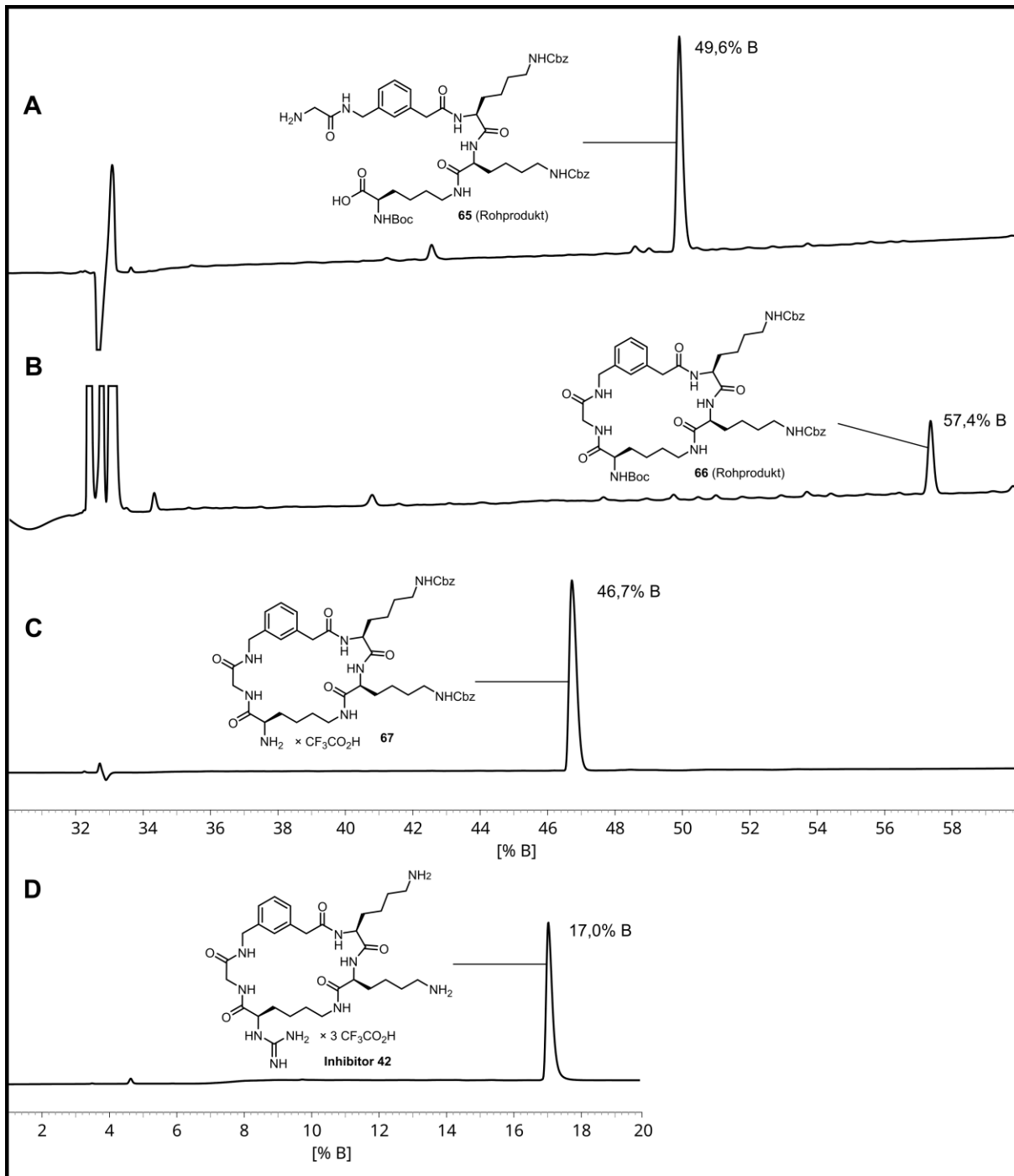
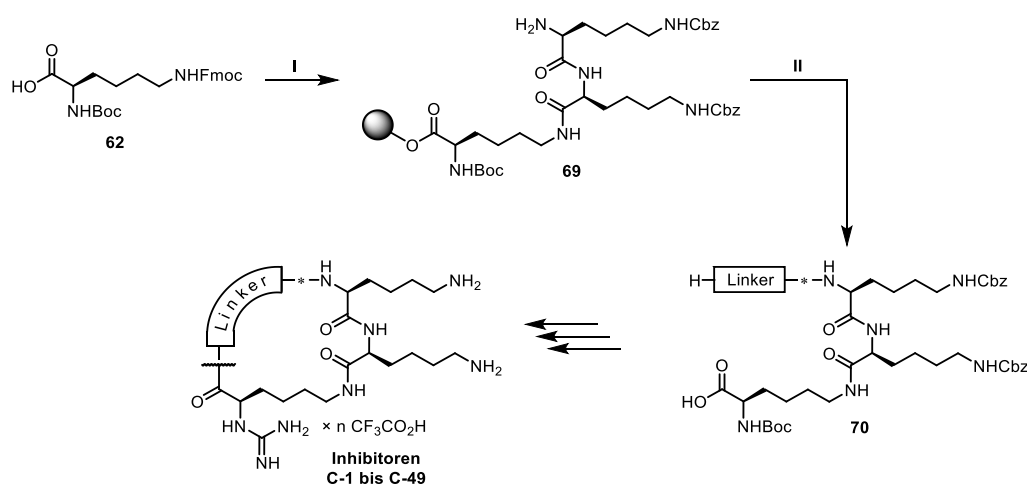


Abbildung 3.34 HPLC-Chromatogramme der Intermediate **65** bis **67** und des Inhibitors **42**. Bedingungen: Start bei 30 % B (Chromatogramme A-C) bzw. 1 % B (Chromatogramm D); Gradient: +1 % B/min. Eine genaue Beschreibung der Methodik ist in Kapitel 5.1 (S.154) zu finden.

3.9.2 Synthese linkermodifizierter Inhibitoren

Die Synthese der linkermodifizierten Inhibitoren **C-1** bis **C-49** erfolgte analog zur Synthese der Leitstruktur (Schema 3.2). Dabei wurde zunächst eine größere Menge des harzgebundenen Tripeptids **69** hergestellt. An kleinere Portionen des Harzes **69** wurden dann sukzessive die Fmoc-geschützten Linkeraminosäuren gekuppelt. Nach der mild-sauren Abspaltung vom Harz wurde das lineare Vorläuferpeptid **70** analog zur Synthese der Leitstruktur **42** zu den finalen Inhibitoren umgesetzt. Mit Ausnahme des P4-Rests der Inhibitoren **C-30** und **C-31** (Arg bzw. D-Arg) wurden sämtliche in das Linkersegment einzubauenden Fmoc-Aminosäuren ohne Seitenkettenschutzgruppe verwendet.



Schema 3.2 Synthese der linkermodifizierten Inhibitoren **C-1** bis **C-49**. (I) 1,0 Äq. 2-CTC-Harz, 4,0 Äq. DIPEA, DCM, 2 h; sukzessive Kupplung von zweimal Fmoc-Lys(Cbz)-OH. Die Kupplungen erfolgten jeweils mit 3,0 Äq. Aminosäure in Gegenwart von 3,0 Äq. HATU und 6,0 Äq. DIPEA in DMF. Nach der Harzbeladung und nach jeder Kupplung wurde Fmoc durch zweimalige Behandlung mit 20 % Piperidin in DMF (V/V) abgespalten (5 min und 15 min). (II) Sukzessive Kupplung der Fmoc-geschützten Linkeraminosäuren jeweils mit anschließender Fmoc-Abspaltung unter den gleichen Bedingungen wie in Schritt I. Von **70** ausgehend wurden die Inhibitoren **C-1** bis **C-49** analog zur Synthese der Leitstruktur **42** (Schema 3.1, S.123) synthetisiert.

Die Verschiebungen der HPLC-Retentionszeiten von Stufe zu Stufe gleichen denen aus der Synthese der Leitstruktur **42** (vgl. Abb. 3.34, S.124). Trotz geringen Abweichungen bei einigen wenigen Verbindungen gilt als Faustregel für das in dieser Arbeit genutzte System, dass pro zusätzlicher Methyl-, Methylen- oder Methingruppe mit einer um 1-2 Minuten erhöhten Retentionszeit zu rechnen ist. In Abbildung 3.35 (S.126) sind exemplarisch die Chromatogramme der Leitstruktur **42** und einiger P ω -modifizierter Derivate gezeigt. Anhand dieser Reihe lässt sich der Verschiebungstrend erkennen. Das D-Homocyclohexylalanin-Derivat **C-8** zeigt in der HPLC ein ausgeprägtes Tailing (Chromatogramm F), das in mehreren unabhängigen Messungen auf verschiedenen Säulen reproduziert wurde. Über mögliche Ursachen ließe sich an dieser Stelle nur spekulieren.

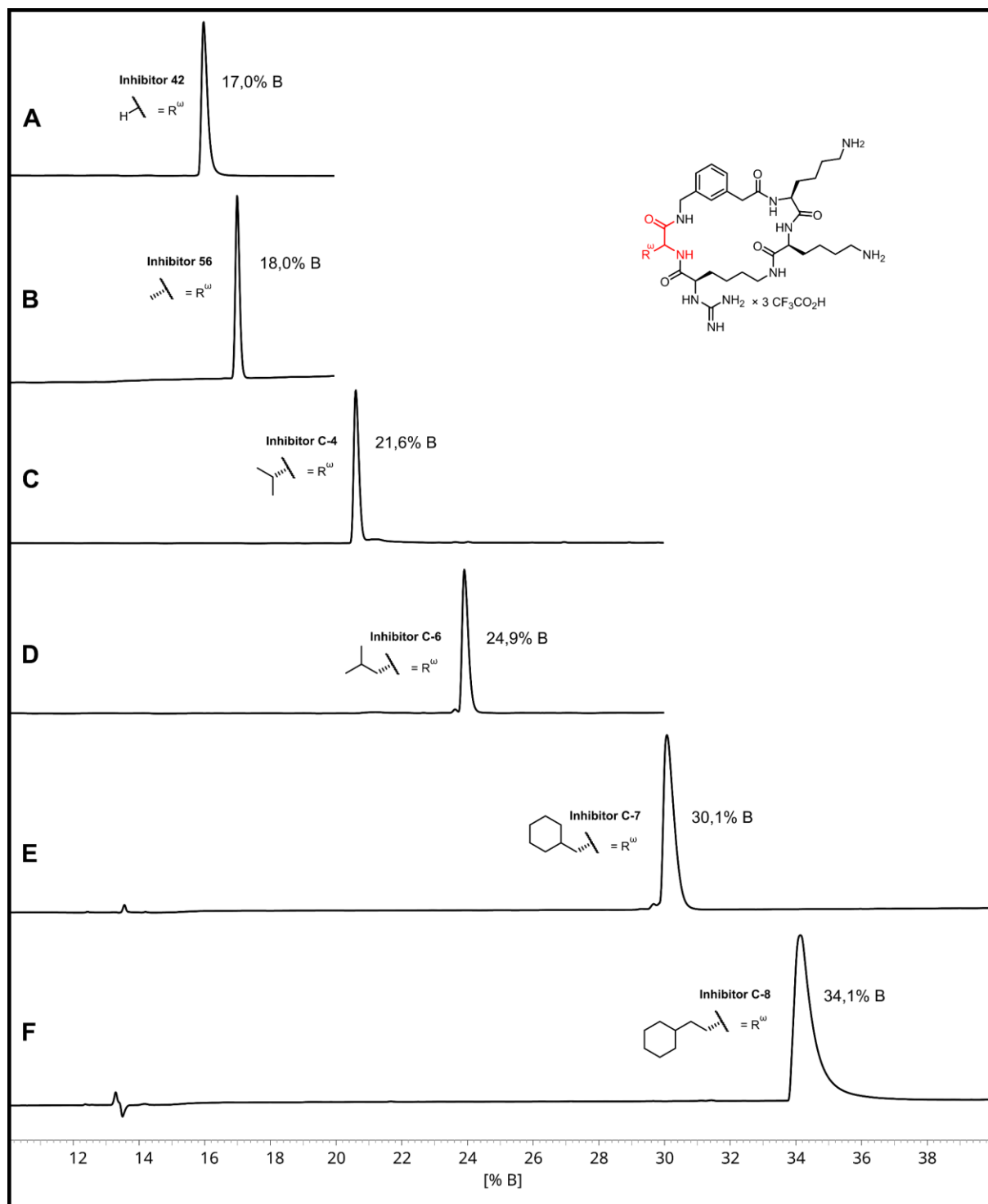
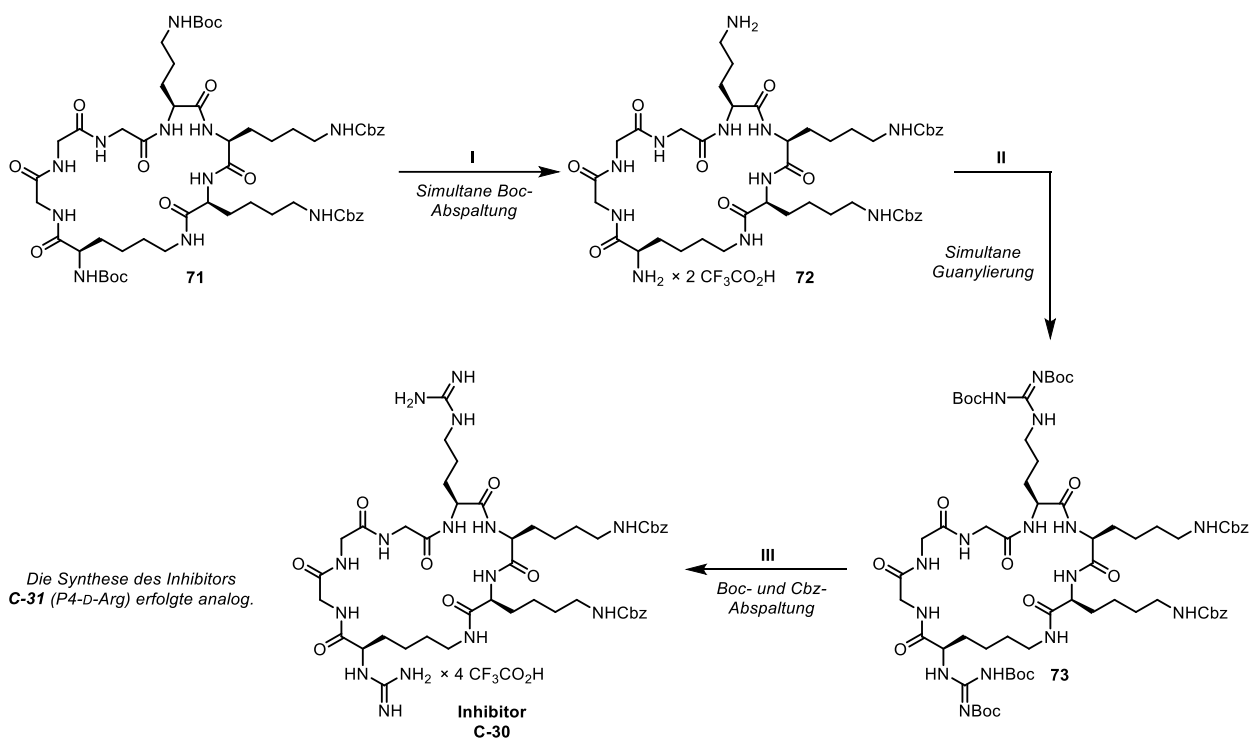


Abbildung 3.35 HPLC-Chromatogramme P ω -modifizierter Inhibitoren und der Leitstruktur **42**. Bedingungen: Start bei 1 % B (A-D) bzw. 10 % B (E und F); Gradient: +1 % B/min. Eine Beschreibung der Methodik ist in Kapitel 5.1 (S.154) zu finden.

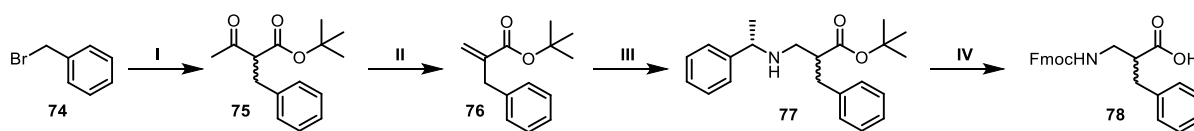
Bei der Synthese der Inhibitoren **C-30** und **C-31** (wie auch bei der Synthese aller weiteren Inhibitoren mit Arginin-Rest außer bei der Synthese von **C-97**) diene Fmoc-Orn(Boc)-OH als Arginin-Präkursor. Die Überführung des Ornithins in ein Arginin ist in Schema 3.3 exemplarisch am Inhibitor **C-30** gezeigt. Im Zuge der Boc-Abspaltung von der P1-Aminogruppe des cyclisierten Intermediats **71** wurde auch die

Boc-Schutzgruppe des Ornithins abgespalten. In der anschließenden Guanylierung des Diamins **72** wurden dann simultan das P1-Amin in ein zweifach Boc-geschütztes Guanidin und das P4-Ornithin in ein zweifach Boc-geschütztes Arginin überführt (Intermediat **73**). Nach der finalen Abspaltung der Boc- und Cbz-Schutzgruppen wurde der Inhibitor **C-30** erhalten. Die Synthese des Inhibitors **C-31** mit D-Arginin als P4-Rest erfolgte analog mit Fmoc-D-Orn(Boc)-OH als D-Arginin-Präkursor.



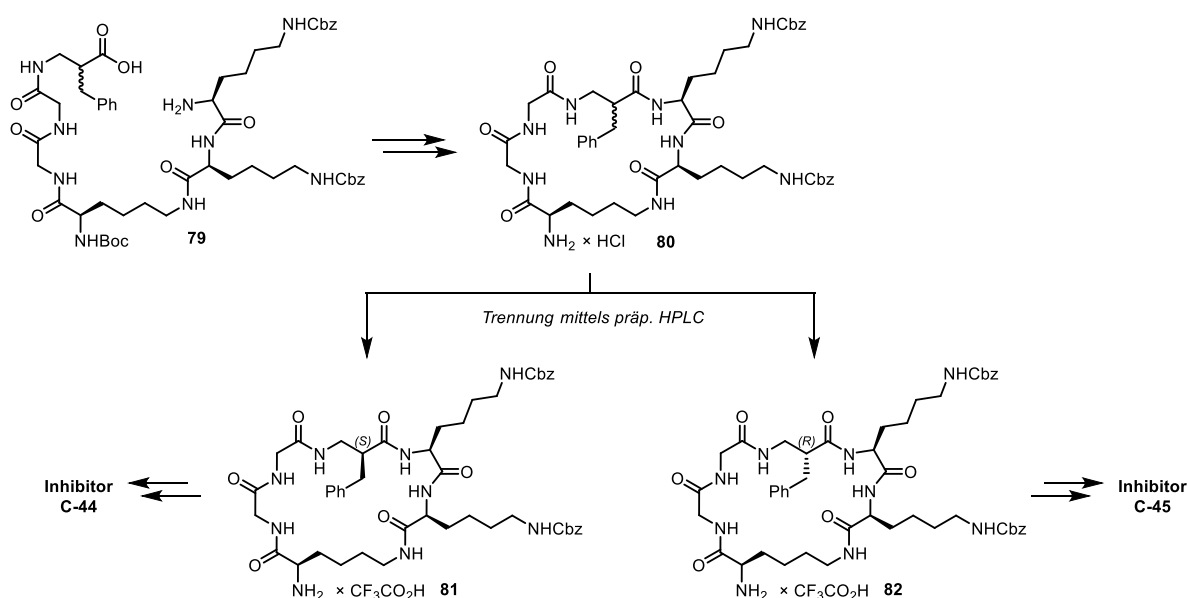
Schema 3.3 Synthese der Inhibitoren **C-30** und **C-31**. (I) 4 M HCl in 1,4-Dioxan, Fällung aus Et₂O, präparative HPLC. (II) 9,0 Äq. *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin, 15,0 Äq. DIPEA, DMF, 48 h. (III) 32 % HBr in AcOH, 2 h, Fällung aus Et₂O, präparative HPLC.

Für die Herstellung der Inhibitoren **C-44** und **C-45** wurde zunächst β^2 -DL-Homophenylalanin mit Fmoc-geschütztem *N*-Terminus nach einer modifizierten Vorschrift von GELLMAN synthetisiert (Schema 3.4, S.128).²³⁶ Dazu wurde Benzylbromid (**74**) unter basischen Bedingungen (KO^t-Bu) mit *tert*-Butylacetoacetat zum racemischen *tert*-Butyl-2-benzylacetoacetat (**75**) umgesetzt. Dieser Ester wurde anschließend mit LHMDS und Paraformaldehyd in einer deacylierenden Kondensationsreaktion zum *tert*-Butylbenzylacrylat **76** umgewandelt.²³⁷ Durch eine Michael-Addition mit (*S*)-1-Phenylethan-1-amin wurde dann die Aminogruppe eingeführt. Obwohl **77** als Mischung zweier Diastereomere erhalten wurde, gelang keine Trennung mit chromatographischen Methoden. Deshalb wurden die Methylbenzyl-Gruppe und die *tert*-Butyl-Schutzgruppe durch katalytische Hydrierung an Pd/C und anschließende Behandlung mit 32 % HBr in AcOH entfernt. Nach Umsetzung mit Fmoc-OSu und anschließender chromatographischer Reinigung wurde das racemische Fmoc-DL- β^2 -Homophenylalanin (**78**) erhalten.



Schema 3.4 Synthese von Fmoc-DL- β^2 -Homophenylalanin. (I) 1,2 Äq. Kalium-*tert*-butanolat, 0,1 Äq. *tert*-Butanol, 1,1 Äq. *tert*-Butylacetoacetat, THF, 65 °C, 6 h, Argonatmosphäre. (II) 1,1 Äq. LHMDs, THF, -78 °C, 30 min, dann Paraformaldehyd im Überschuss und anschließendes Erwärmen auf RT, dann 6 h Rühren, Argonatmosphäre. (III) 5,0 Äq. (*S*)-1-Phenylethan-1-amin, Methanol, 60 °C, 120 h, Argonatmosphäre. (IV) 10 % (m/m) Pd (10 % auf Aktivkohle), AcOH/Wasser 9:1, RT, 18 h, Wasserstoffatmosphäre; dann 32 % HBr in AcOH, 2 h, Fällung aus Et₂O; dann 0,95 Äq. Fmoc-OSu, 2,0 Äq. DIPEA, 1,4-Dioxan/Wasser 3:2 (V/V), RT, 18 h.

Bei der Synthese cyclischer Derivate der Leitstruktur **42** spielt es prinzipiell keine Rolle, mit welchem Rest die initiale Harzbeladung erfolgt. Im Gegensatz zu den HATU-medierten Kupplungen, die mit einem dreifachen Aminosäureüberschuss durchgeführt werden, erfolgt die Harzbeladung mit äquimolaren Stoffmengen. Deshalb wurde bei der Synthese der Inhibitoren **C-44** und **C-45** abweichend von den Synthesen der übrigen linkermodifizierten Derivate das Harz mit dem P4-Baustein Fmoc-DL- β^2 -Homophenylalanin (**78**) beladen, um möglichst geringe Mengen dieser aufwendig hergestellten Aminosäure einsetzen zu müssen. Nach anschließender Fmoc-Festphasenpeptidsynthese wurde entsprechend das lineare Peptid **79** erhalten (Schema 3.5; die zugehörigen HPLC-Chromatogramme sind in Abb. 3.36 gezeigt).



Schema 3.5 Synthese der Inhibitoren **C-44** und **C-45**. Die Synthese der Vorläufer **79** und **80** (jeweils als Diastereomergemisch) erfolgte analog zur Synthese der Leitstruktur **42** (Schema 3.1, S.123), wobei die initiale Harzbeladung abweichend mit dem P4-Baustein **78** erfolgte. Nach der Trennung der Diastereomere **81** und **82** wurden diese analog zur Synthese der Leitstruktur separat zu den Inhibitoren **C-44** bzw. **C-45** umgesetzt.

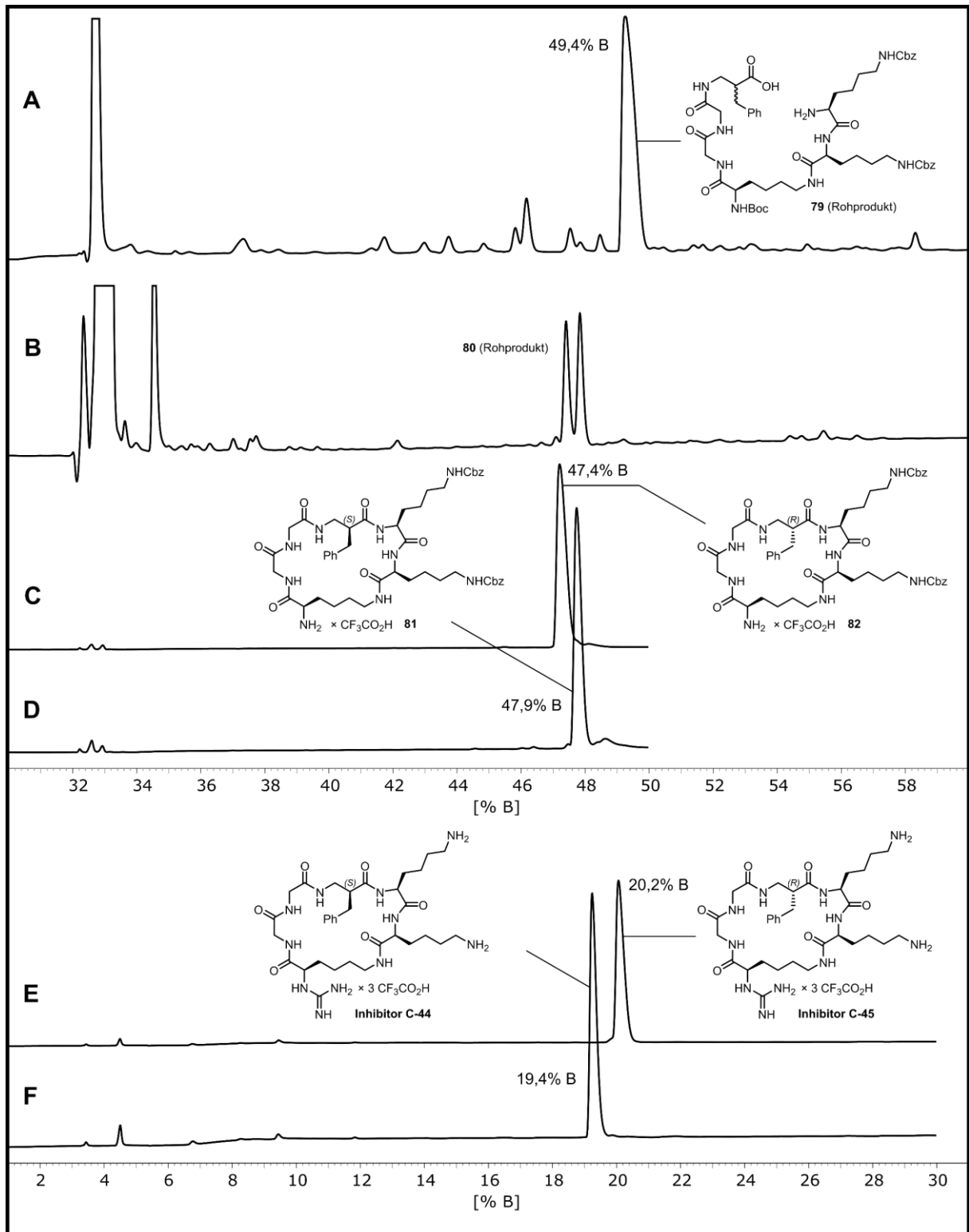
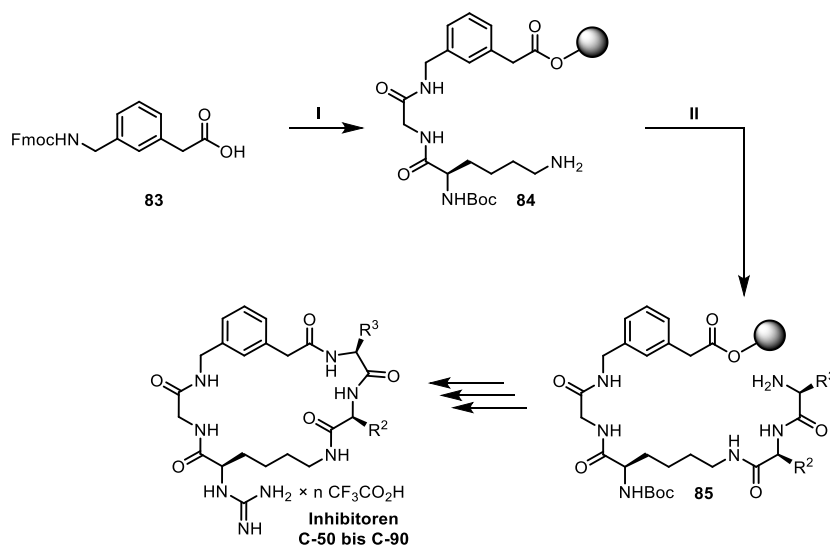


Abbildung 3.36 HPLC-Chromatogramme der Inhibitoren **C-44** und **C-45** sowie ihrer Vorstufen. Bedingungen: Start bei 30 % B (Chromatogramme **A-D**) bzw. 1 % B (Chromatogramme **E** und **F**); Gradient: +1 % B/min. Anders als beim linearen Peptid **79** kommt es beim cyclischen Intermediat **80** zu einer Aufspaltung des Diastereomergemischs, wodurch die Trennung von **81** und **82** mittels präparativer HPLC möglich wird. Eine genaue Beschreibung der Methodik ist in Kapitel 5.1 (S.154) zu finden.

Die beiden Diastereomere des Peptids **79** waren mit chromatographischen Methoden nicht voneinander zu trennen (Abb. 3.36A). Nach Cyclisierung und anschließender Boc-Abspaltung wurde das Diastereomeregemisch **80** erhalten. Dieses ließ sich nun, vermutlich wegen der durch die Cyclisierung entstandenen Nähe des P4-Stereozentrums zum Stereozentrum des P3-Lysins, mittels präparativer HPLC in die Diastereomere **81** und **82** auftrennen (Abb. 3.36B und D). Die Verbindungen **81** und **82** wurden dann separat der Synthese der Leitstruktur analog zu den Inhibitoren **C-44** bzw. **C-45** umgesetzt (Abb. 3.36E und F). Interessanterweise hat das Intermediat **81** mit D-konfiguriertem P4-Rest eine etwas größere Retentionszeit als sein L-Analogon **82**, wohingegen es sich auf der Stufe der finalen Inhibitoren genau umgekehrt verhält, also das D- β^2 -Homophenylalanin-Derivat **C-44** etwas kürzer auf der HPLC-Säule verweilt als das L-Derivat **C-45**.

3.9.3 Synthese P3- oder P2-modifizierter Inhibitoren

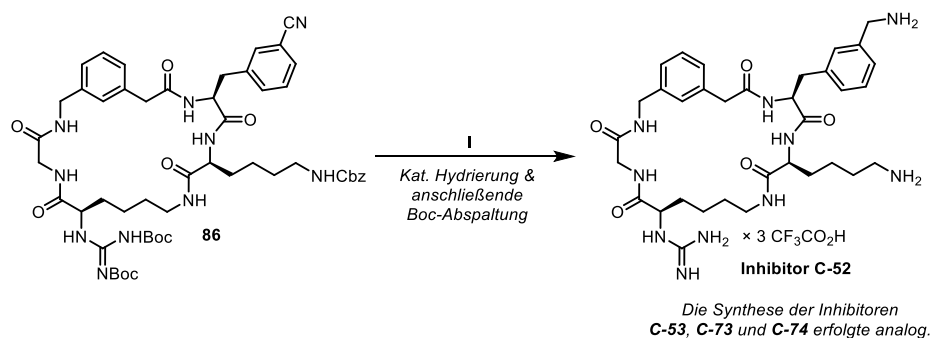
Zur Synthese der P3- bzw. P2-modifizierten Derivate **C-50** bis **C-90** wurde ein 2-CTC-Harz initial mit Fmoc-3-Amphac-OH (**83**) beladen und anschließend in das harzgebundene Peptid **84** überführt (Schema 3.6). Letzteres wurde in kleinere Portionen aufgeteilt und durch sukzessive Kupplung des P2- und des P3-Rests ins entsprechende harzgebundene Peptid **85** überführt, das anschließend analog zur Synthese der Leitstruktur **42** zum jeweiligen Inhibitor umgesetzt wurde.



Schema 3.6 Synthese der P3- und P2-modifizierten Inhibitoren **C-50** bis **C-90**. (I) 1,0 Äq. 2-CTC-Harz, 4,0 Äq. DIPEA, DCM, 2 h; sukzessive Kupplung von Fmoc-Gly-OH und Boc-D-Lys(Fmoc)-OH. Die Kupplungen erfolgten jeweils mit 3,0 Äq. Aminosäure in Gegenwart von 3,0 Äq. HATU und 6,0 Äq. DIPEA in DMF. Nach der initialen Harzbeladung mit Fmoc-3-Amphac-OH (**83**) und nach jeder Kupplung wurde Fmoc durch zweimalige Behandlung mit 20 % Piperidin in DMF (V/V) abgespalten (5 min und 15 min). (II) Sukzessive Kupplung der Fmoc-geschützten P2- und P3-Aminosäuren bzw. ihrer Präkursoren jeweils mit anschließender Fmoc-Abspaltung unter den gleichen Bedingungen wie in Schritt II. Vom Intermediat **85** ausgehend wurden die Inhibitoren **C-50** bis **C-90** analog zur Synthese der Leitstruktur **42** (Schema 3.1, S.123) synthetisiert. Eventuell abweichende Syntheseschritte werden im Folgenden beschrieben.

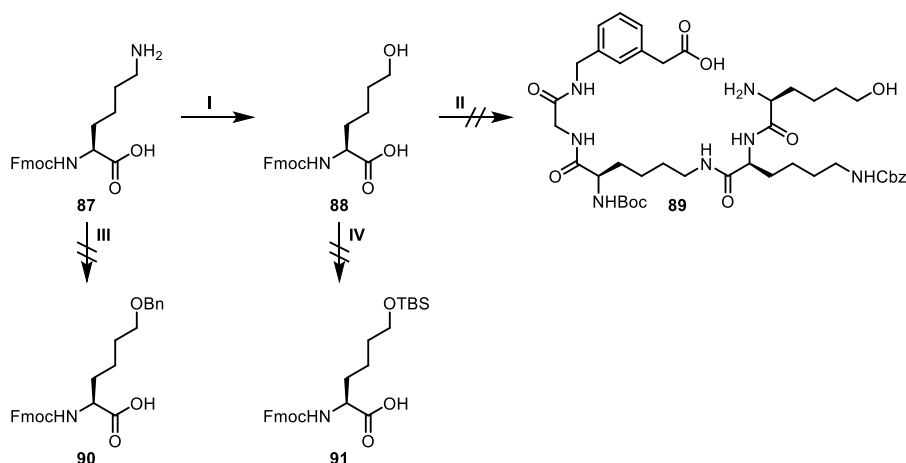
Folgende geschützten Aminosäurederivate wurden für den Einbau in die P2- oder die P3-Position eingesetzt: Fmoc-Lys(Cbz)-OH, Fmoc-Dab(Cbz)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OH und Fmoc-Trp(Boc)-OH. Alle übrigen Aminosäuren wurden ohne Seitenkettenschutzgruppe eingesetzt oder aber, wie im Folgenden beschrieben, im Laufe der Inhibitorsynthese aus Präkursoren generiert. Zur Synthese der Arginin- und- Norarginin-Derivate **C-50** und **C-51** bzw. **C-71** und **C-72** wurden analog zur Synthese der Inhibitoren **C-30** und **C-31** (vgl. Schema 3.3, S.127) Fmoc-Dab(Boc)-OH und Fmoc-Orn(Boc)-OH als Norarginin- bzw. Arginin-Präkursor eingesetzt.

Bei der Synthese der Inhibitoren mit einem Aminomethylphenylalanin als P3- oder P2-Rest (**C-52**, **C-53**, **C-73** und **C-74**) wurden Fmoc-Phe(3-CN)-OH bzw. Fmoc-Phe(4-CN)-OH als Vorstufen eingesetzt. Die Überführung des Cyanophenylalanins in das entsprechende Aminomethylphenylalanin erfolgte durch katalytische Hydrierung an Pd/C im Anschluss an die Guanylierung des P1-Amins (wobei gleichzeitig die Cbz-Gruppe abgespalten wurde). In Schema 3.7 ist stellvertretend die Überführung des Cyanophenylalanin-Intermediats **86** in den finalen Inhibitor **C-52** gezeigt.



Schema 3.7 Synthese der Inhibitoren **C-52**, **C-53**, **C-73** und **C-74**. (I) 10 % (m/m) Pd (10 % auf Aktivkohle), Essigsäure/Wasser 9:1, RT, 18 h, Wasserstoffatmosphäre; dann 32 % HBr in AcOH, 2 h, Fällung aus Et₂O, präparative HPLC.

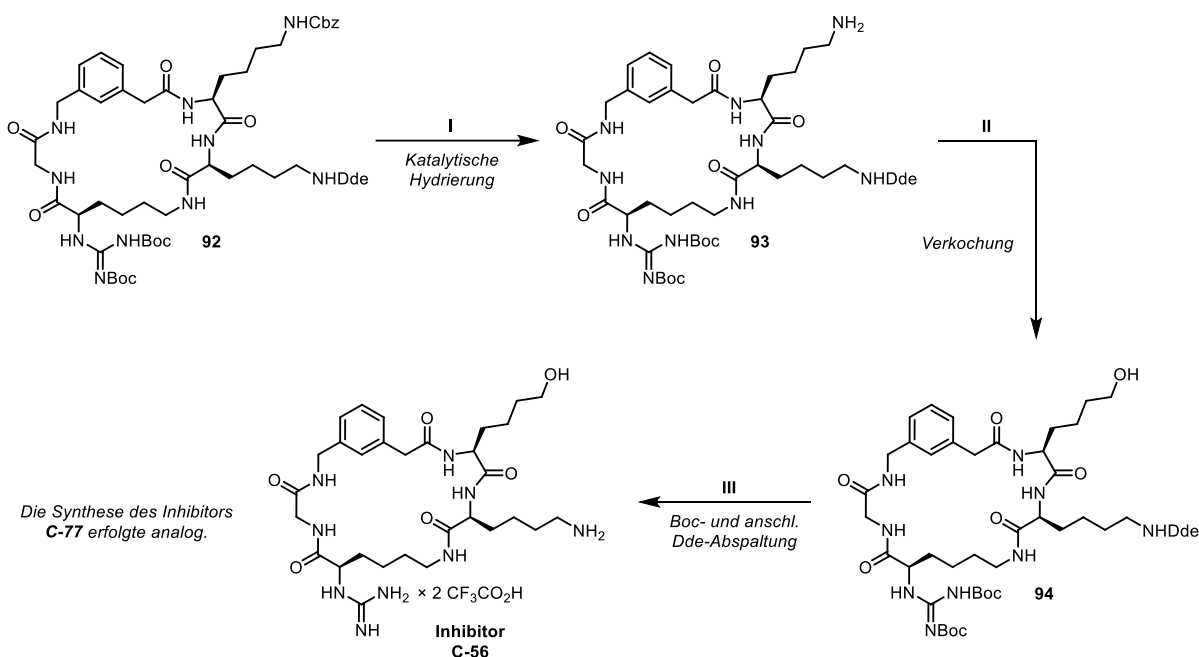
Für die Synthese der ϵ -Hydroxy-Norleucin-Derivate **C-56** und **C-77** wurde zunächst aus Fmoc-Lys-OH (**87**) das Fmoc-geschützte ϵ -Hydroxy-Norleucin (**88**) hergestellt (Schema 3.8, S.132). Dazu wurde Fmoc-Lys-OH einer Verkochungsreaktion analog mit NaNO₂ und AcOH in einem THF/Wasser-Gemisch (2:1 V/V) umgesetzt. Auf diese Weise wurde Fmoc-Nle(ϵ -OH)-OH in einer moderaten Ausbeute von 32 % erhalten. Diese Fmoc-geschützte Aminosäure wurde anschließend versuchsweise ohne Seitenkettenschutzgruppe in der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt, wodurch allerdings nur ein Gemisch unübersichtlich vieler Produkte erzeugt wurde und das gewünschte Peptid **89** nicht isoliert werden konnte.



Schema 3.8 Synthese von Fmoc-Nle(ε-OH)-OH(88) und Syntheseversuche zur Herstellung von 89, 90 bzw. 91. (I) 5,0 Äq. AcOH, 2,0 Äq. NaNO₂, THF/Wasser 5:1 (V/V), RT, 24 h. (II) Sukzessive Kupplung von Fmoc-Gly-OH, Boc-D-Lys(Fmoc)-OH, Fmoc-Lys(Cbz)-OH, Fmoc-Nle(ε-OH)-OH an ein mit Fmoc-3-Amphac-OH beladenes Harz, die Kupplungen erfolgten jeweils mit 3,0 Äq. Aminosäure in Gegenwart von 3,0 Äq. HATU und 6,0 Äq. DIPEA in DMF. Nach der initialen Harzbeladung und nach jeder Kupplung wurde Fmoc durch zweimalige Behandlung mit 20 % Piperidin in DMF (V/V) abgespalten (5 min und 15 min); anschließend 1 % TFA in DCM (V/V), 4 × 30 min, Neutralisierung der isolierten Abspaltungslösung nach jeweils 30 min mit DIPEA. (III) 5,0 Äq. AcOH, 2,0 Äq. NaNO₂, THF/BnOH 5:1 (V/V), RT, 24 h. (IV) 1,5 Äq. TBSCl, 2,5 Äq. Imidazol, DCM, RT, 48 h, Argonatmosphäre.

Daher wurde versucht, Fmoc-Lys-OH mit NaNO₂ und AcOH in einem THF/Benzylalkohol-Gemisch (2:1 V/V) zum Fmoc-Nle(ε-OBn)-OH (90) umzusetzen, wobei jedoch kein Umsatz beobachtet wurde. Die Schützung der Seitenkette des Fmoc-Nle(ε-OH)-OH als TBS-Ether (91) gelang unter den in Schema 3.8 angegebenen Bedingungen ebenfalls nicht. Daher wurde bei der Synthese der Inhibitoren C-56 und C-77 erneut eine Präkursorstrategie genutzt; als Präkursor des ε-Hydroxy-Norleucins wurde Fmoc-Lys(Cbz)-OH eingesetzt. Dies machte eine weitere, zu Fmoc, Boc und Cbz orthogonale Aminschutzgruppe erforderlich, um gezielt nur den P3- bzw. den P2-Rest ins ε-Hydroxy-Norleucin überführen zu können. Zu diesem Zwecke wurde Fmoc-Lys(Dde)-OH als geschützter Lysin-Baustein eingesetzt. Die Schritte zur Überführung des Präkursor-Rests in den finalen Inhibitor sind in Schema 3.9 stellvertretend an der Synthese des Inhibitors C-56 dargestellt. Die Synthese des Intermediats 92 erfolgte wie in Schema 3.6 (S.130) gezeigt. Durch katalytische Hydrierung an Pd/C wurde selektiv die Cbz-Gruppe von der P3-Seitenkette abgespalten, während die Boc-Schutzgruppen am P1-Rest und die Dde-Schutzgruppe am P2-Rest erhalten blieben. Dann wurde die freie Aminogruppe der erhaltenen Verbindung 93 in eine Hydroxygruppe überführt. Diese Umsetzung erfolgte unter den gleichen Bedingungen, unter denen auch Fmoc-Lys-OH in Fmoc-Nle(ε-OH)-OH überführt worden war (vgl. Schema 3.8), also mit NaNO₂ und AcOH in einem THF/Wasser-Gemisch (2:1 V/V). Die Boc-Gruppen wurden von der so erhaltenen Verbindung 94 mit TFA abgespalten. Anschließend wurde mittels präparativer HPLC gereinigt, die Dde-Schutzgruppe unter milden Bedingungen nach BRADLEY²³⁸ mit NH₂OH×HCl/Imidazol in NMP/DCM abgespalten und erneut mittels präparativer HPLC gereinigt. Auf diese Weise konnte eine ausreichend große Menge des Inhibitors C-56 (7,0 mg;

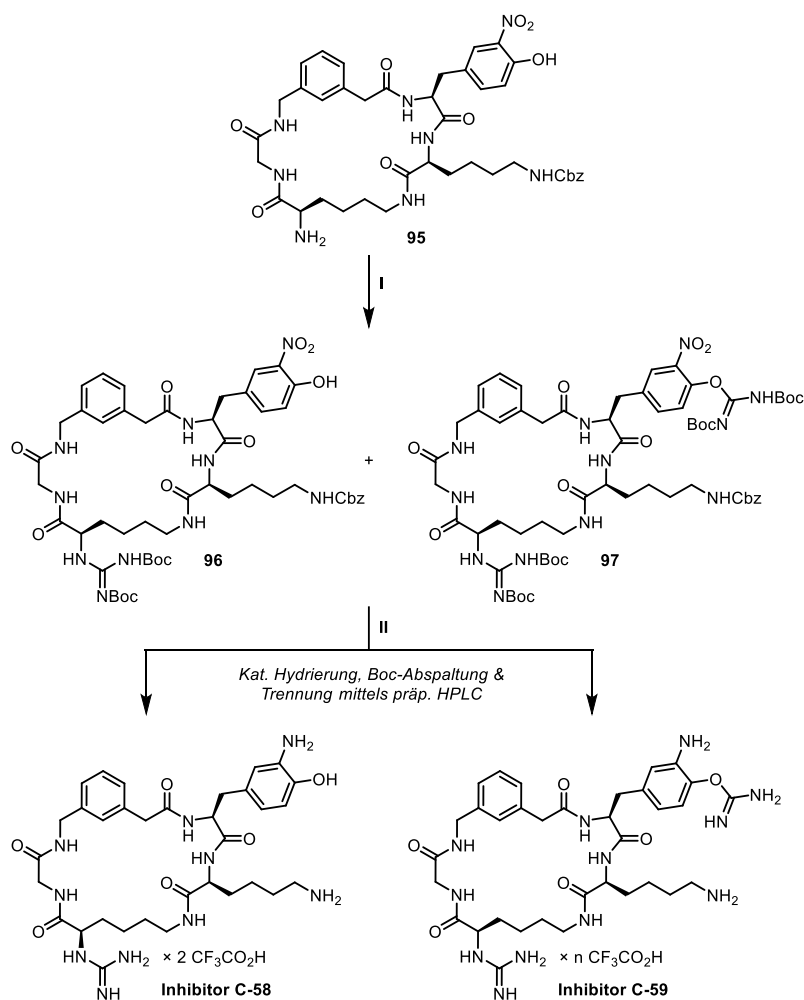
2,4 % Ausbeute über alle Stufen) isoliert werden, um diesen enzymkinetisch zu charakterisieren und im Komplex mit der ZIKV-Protease zu kristallisieren. Vom auf die gleiche Weise hergestellten P2-Analogon **C-77** wurde eine geringere Ausbeute isoliert (2,0 mg; 0,7 % über alle Stufen), die aber dennoch für die enzymkinetische Charakterisierung ausreichte.



Schema 3.9 Synthese der Inhibitoren **C-56** und **C-77**. (I) 10 % (m/m) Pd (10 % auf Aktivkohle), AcOH/Wasser 9:1, 18 h, Wasserstoffatmosphäre; (II) 5,0 Äq. AcOH, 2,0 Äq. NaNO₂, THF/Wasser 5:1 (V/V), 24 h; (III) TFA im Überschuss, Fällung aus Et₂O, präparative HPLC; dann Dde-Abspaltung nach BRADLEY²³⁸ mit NH₂OH×HCl/Imidazol in NMP/DCM, präparative HPLC.

Als Präkursor der 3-Aminotyrosin-Derivate **C-58** (P3) und **C-79** (P2) diente Fmoc-Tyr(3-NO₂)-OH. Die entscheidenden Schritte der Umwandlung des Nitrotyrosins ins Aminotyrosin sind in Schema 3.10 (S.134) stellvertretend an der Synthese des Inhibitors **C-58** gezeigt. Im Anschluss an die Guanylierung des P1-Amins des Intermediats **95** wurde das Nitrotyrosin durch katalytische Hydrierung an Pd/C in das Aminotyrosin überführt (wobei gleichzeitig die Cbz-Gruppe abgespalten wurde). Nach Boc-Abspaltung mit 32 % HBr in AcOH und präparativer HPLC wurde der Inhibitor **C-58** erhalten. Als Nebenreaktion wurde bei der Guanylierung des P1-Amins des Intermediats **95** auch die Überführung der Hydroxygruppe des Nitrotyrosins in einen Isoharnstoff beobachtet. Das Hauptprodukt **96** wurde nicht vom Nebenprodukt **97** abgetrennt, sondern mit diesem gemeinsam in den folgenden Schritten umgesetzt. Im finalen Reinigungsschritt konnte der Inhibitor **C-58** vom Isoharnstoffnebenprodukt **C-59** abgetrennt werden. Das P2-Aminotyrosin-Derivat **C-79** wurde auf analoge Weise hergestellt, dabei wurde ebenfalls ein Isoharnstoff-Inhibitor (**C-80**) als Nebenprodukt erhalten. Das Stoffmengenverhältnis des gewünschten Produkts **C-58** zum Nebenprodukt **C-59** betrug ca. 4:1, das von **C-79** zu

C-80 ca. 3:2. Eine genaue Angabe ist wegen des unbekanntenen Protonierungsgrads des Isoharnstoffs nicht möglich. Eine Bildung von Isoharnstoffen trat auch bei der Synthese des Tyrosin-Derivats **C-57** im Rahmen der Masterarbeit von L.C. SCHMACKE auf.²⁰⁷

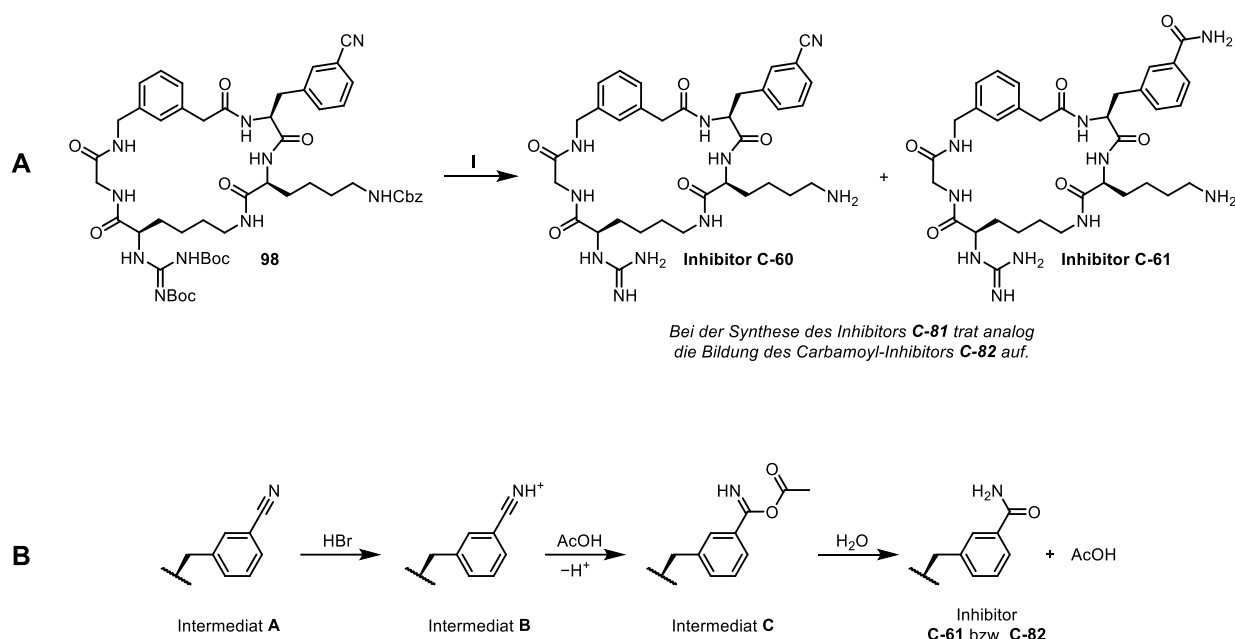


Die Synthese der Inhibitoren C-79 und C-80 erfolgte analog.

Schema 3.10 Synthese der Inhibitoren mit 3-Aminotyrosin in P3- (**C-58**) bzw. P2-Position (**C-79**). Die Isoharnstoff-Derivate **C-59** bzw. **C-80** wurden als Nebenprodukte dieser Synthesen isoliert. (I) 4,5 Äq. *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin, 7,5 Äq. DIPEA, DMF, 48 h; (II) 10 % (m/m) Pd (10 % auf Aktivkohle), Essigsäure/Wasser 9:1, 18 h, Wasserstoffatmosphäre; dann 32 % HBr in AcOH, 2 h, Fällung aus Et₂O, präparative HPLC.

Die Inhibitoren mit 3-Carbamoylphenylalanin in P3- (**C-61**) bzw. P2-Position (**C-82**) sind Nebenprodukte der Synthese der 3-Cyanophenylalanin-Derivate **C-60** und **C-81** (Schema 3.11A). Das Auftreten des Carbamoylnebenprodukts wurde im Anschluss an die Abspaltung der Cbz-Gruppe und der Boc-Gruppen von der Verbindung **98** bzw. dessen P2-Analogons mit 32 % HBr in AcOH beobachtet. Die Umwandlung von Benzonitrilen in die entsprechenden Benzamide bei Raumtemperatur in TFA oder AcOH in Gegenwart starker Säuren wie H₂SO₄ und anschließender wässriger Aufarbeitung

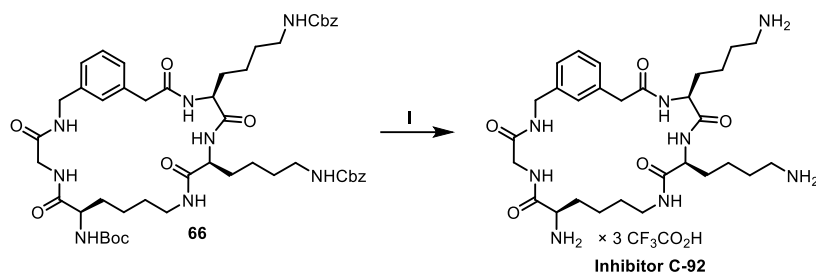
ist in der Literatur beschrieben.²³⁹ Auf Basis dieser bekannten Reaktionen lässt sich der Mechanismus der Umwandlung von Benzonitrilen in Benzamide mit HBr/AcOH folgendermaßen aufstellen (Schema 3.11B): HBr protoniert die Nitrilgruppe der Ausgangsverbindung **A**. Die Elektrophilie des Nitril-Kohlenstoffs wird dadurch erhöht, weshalb das Intermediat **B** durch Essigsäure nucleophil angegriffen wird. Das dadurch entstandene Benzimidssäure-Essigsäure-Anhydrid **C** wird bei wässriger Aufarbeitung zum Benzamid **D** hydrolysiert; im Falle der Inhibitoren **C-61** und **C-82** geschah diese Hydrolyse vermutlich während der Aufreinigung mittels präparativer HPLC.



Schema 3.11 Synthese der Inhibitoren **C-60** und **C-81**. (A) Die Inhibitoren **C-61** bzw. **C-82** wurden als Nebenprodukte dieser Synthesen isoliert. (I) 32 % HBr in AcOH, 2 h, Fällung aus Et₂O, präparative HPLC. (B) Möglicher Mechanismus der Umwandlung einer Nitril- in eine Carbamoylgruppe mit HBr in AcOH.

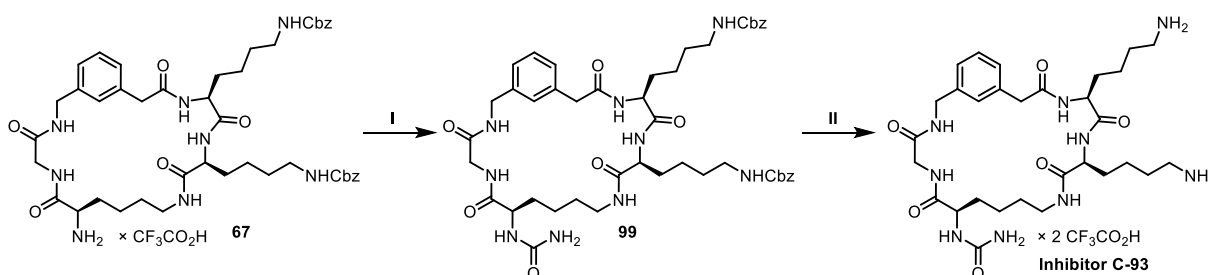
3.9.4 Synthese P1-modifizierter Inhibitoren

Bei der Synthese des Inhibitors **C-91** (das Analogon der Leitstruktur **42** mit einem L-Lysin-Derivat in P1-Position) wurde im ersten Schritt ein 2-CTC-Harz mit Boc-L-Lys(Fmoc)-OH beladen. Alle folgenden Schritte entsprechen denen der Synthese der Leitstruktur **42** (vgl. Schema 3.1, S.123). Bei der Synthese des Inhibitors **C-92** mit einer Aminofunktion in P1-Position wurde analog zur Synthese der Leitstruktur **42** das Intermediat **66** hergestellt. Von diesem Intermediat wurden durch Behandlung mit HBr in AcOH die Cbz-Gruppen und die Boc-Gruppe abgespalten. Nach Reinigung mittels präparativer HPLC wurde der Inhibitor **C-92** erhalten (Schema 3.12, S.136).



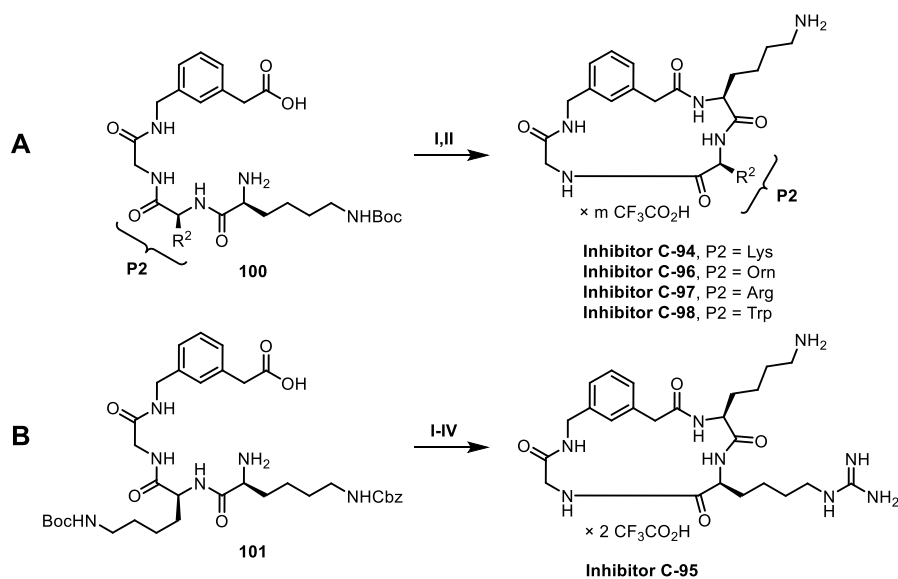
Schema 3.12 Synthese des Inhibitors **C-92** aus dem Intermediat **66** der Synthese der Leitstruktur (vgl. Schema 3.1, S.123). (I) 32 % HBr in AcOH, 2 h, Fällung aus Et₂O, präparative HPLC.

Bei der Synthese des Inhibitors **C-93** mit einer Harnstofffunktion in P1-Position wurde zunächst ebenfalls analog zur Synthese der Leitstruktur **42** verfahren, allerdings bis zum Intermediat **67** (Schema **3.13**). Dieses Intermediat wurde mit TMS-Isocyanat unter basischen Bedingungen in den Harnstoff **99** überführt, der dann durch Behandlung mit HBr in AcOH und anschließende präparative HPLC in den Inhibitor **C-93** überführt wurde.



Schema 3.13 Synthese des Inhibitors **C-93** aus dem Intermediat **67** aus der Synthese der Leitstruktur (vgl. Schema 3.1, S.123); (I) 3,0 Äq. TMS-Isocyanat, 6,0 Äq. DIPEA, DCM, 40 h; (II) 32 % HBr in AcOH, 2 h, Fällung aus Et₂O, präparative HPLC.

Die Synthese der Inhibitoren **C-94** bis **C-98** ohne das guanylierte D-Lysin als P1-Rest erfolgte analog zu der im Kapitel 3.9.2 (S.125) beschriebenen Synthese linkermodifizierter Derivate. In die lineare Vorstufe **100** wurden der P3- und der P2-Baustein jeweils mit Boc-Schutzgruppe bzw. Arginin mit Pbf-Schutzgruppe eingebaut, sodass nach *head-to-tail*-Cyclisierung und Boc- bzw. Pbf-Abspaltung mit TFA die finalen Inhibitoren erhalten wurden (Schema 3.14A). Bei der Synthese des Inhibitors **C-95** war die Seitenkette des P3-Lysins Cbz-geschützt (Schema 3.14B). Dadurch konnte die Boc-Gruppe nach der Cyclisierung des linearen Intermediats **101** selektiv vom P2-Lysin abgespalten werden. Durch Guanylierung wurde der P2-Rest dann in ein zweifach Boc-geschütztes Homoarginin überführt. Nach finaler Abspaltung der Schutzgruppen mit HBr in AcOH wurde dann der Inhibitor **C-95** erhalten.



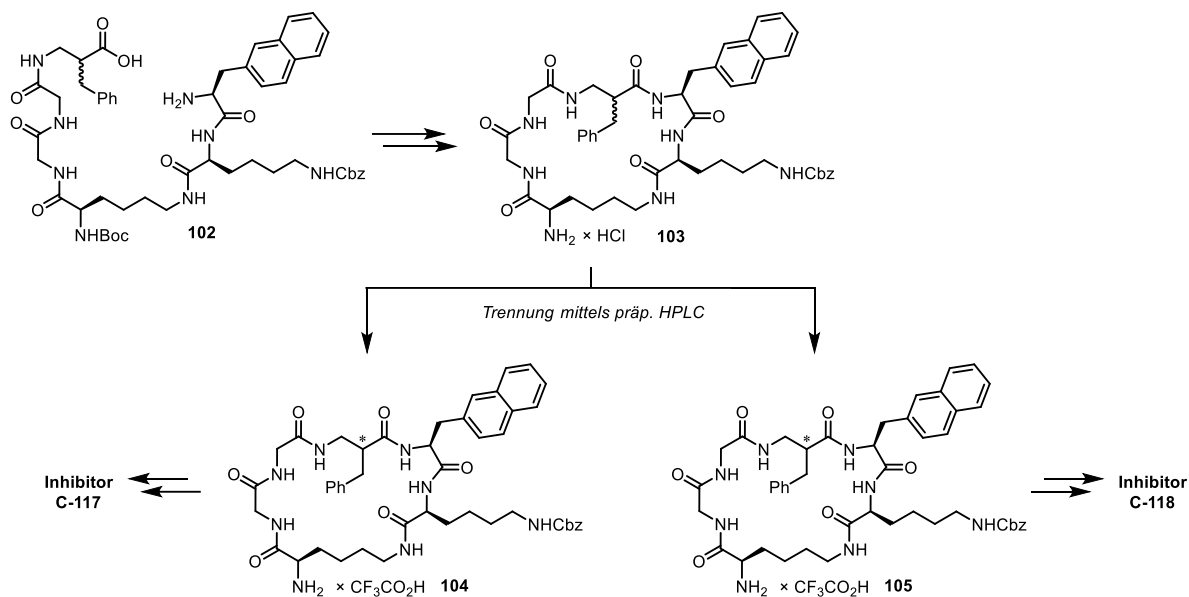
Schema 3.14 Synthese der Inhibitoren **C-94** bis **C-98**. (I) 3,0 Äq. HATU, 6,0 Äq. DIPEA, DMF, 2 h (Peptidkonzentration ca. 2 mM); (II) 4 M HCl in 1,4-Dioxan, Fällung aus Et₂O, präparative HPLC; (III) 4,5 Äq. *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin, 7,5 Äq. DIPEA, DMF, 48 h; (IV) 32 % HBr in AcOH, 2 h, Fällung aus Et₂O, präparative HPLC. Auf der Stufe des Intermediats **100** war die Seitenkette des P2-Rests wie folgt geschützt: Lys(Boc), Orn(Boc), Arg(Pbf), Trp(Boc).

3.9.5 Synthese P_ω-modifizierter Derivate des Inhibitors **C-14**

Die Inhibitoren **C-99** bis **C-101** wurden analog zu der im Kapitel 3.9.2 (S.125) beschriebenen Synthese linkermodifizierter Derivate hergestellt.

3.9.6 Synthese kombinierter Derivate mit erhöhter Lipophilie

Die Synthese der Inhibitoren **C-102** bis **C-116** erfolgte analog zur Synthese der Leitstruktur **42** (vgl. Schema 3.1, S.123), eventuell mit Abwandlungen wie in den Abschnitten zu den Linker-, P₃- bzw. P₂-modifizierten Derivaten beschrieben (Kapitel 3.9.3, S.130 ff.). Die Synthese des linearen Vorläufer-Peptids erfolgte stets beginnend mit der Harzbeladung mit dem P₁-Baustein Boc-D-Lys(Fmoc)-OH oder dem P₄-Baustein Fmoc-3-Amphac-OH. Die Carbamoylphenylalanin-Derivate **C-113**, **C-115** und **C-116** wurden als Nebenprodukte bei der Synthese der entsprechenden Aminomethylphenylalanin-Derivate erhalten (vgl. Schema 3.11, S.135). Die Synthese der Inhibitoren **C-117** und **C-118** (Schema 3.15, S.138) mit D- bzw. L-β²-Homophenylalanin als P₄- und 2-Naphthylalanin als P₃-Rest erfolgte analog zur Synthese der Inhibitoren **C-44** und **C-45** (vgl. Schema 3.5, S.128). Auch hier wurde zunächst das lineare Peptid **102** als Diastereomerenmisch hergestellt. Da die Diastereomere auf der Stufe der Verbindung **102** untrennbar waren, wurden sie in das Gemisch cyclischer Diastereomere **103** überführt, das mittels präparativer HPLC in die Intermediate **104** und **105** aufgetrennt wurde. Aus diesen wurden die finalen Inhibitoren synthetisiert.

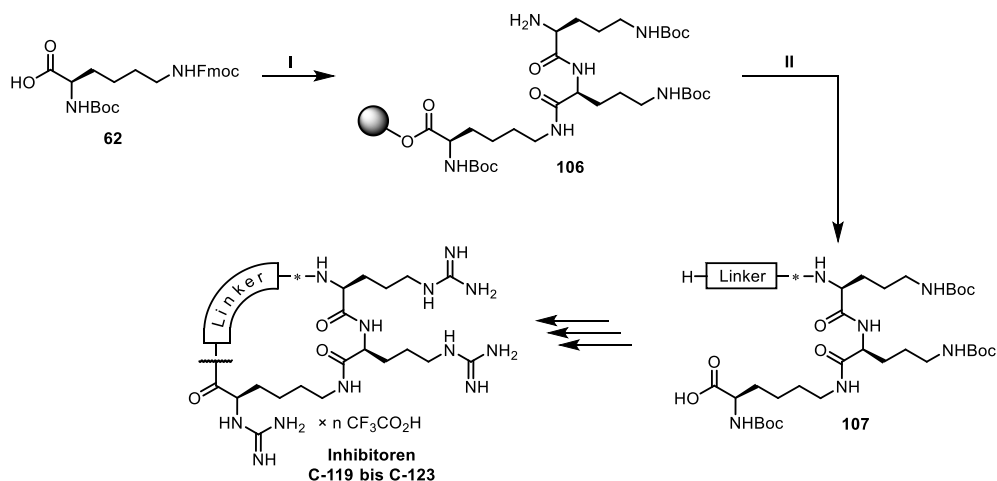


Schema 3.15 Synthese der Inhibitoren **C-117** und **C-118**. Die Synthese der gemeinsamen Vorläufer **102** und **103** erfolgte analog zur Synthese der Leitstruktur **42** (vgl. Schema 3.1, S.123). Nach der Trennung der Diastereomere **104** und **105** wurden diese separat zu den Inhibitoren **C-117** bzw. **C-118** umgesetzt.

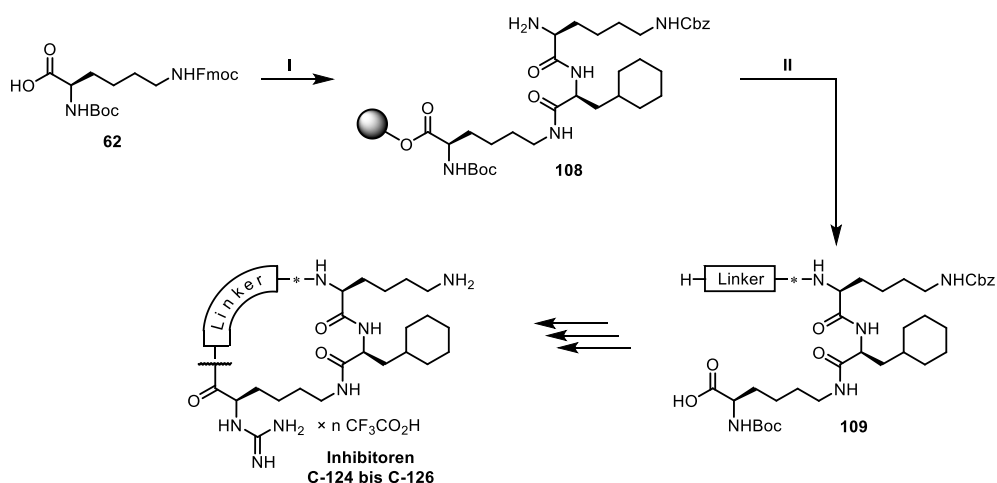
3.9.7 Synthese potentiell zellpenetrierender Inhibitoren

Die Inhibitoren **C-119** bis **C-123**, die jeweils Arginin als P3- und P2-Rest und ein N_{α} -guanyliertes D-Lysin als P1-Rest enthalten, wurden der Synthese der Leitstruktur analog synthetisiert (Schema **3.16**; vgl. Schema **3.1**, S.123). Als Arginin-Präkursor wurde dabei Fmoc-Orn(Boc)-OH eingesetzt. Zunächst wurde ausgehend von Boc-D-Lys(Fmoc)-OH das harzgebundene Tripeptid **106** hergestellt. Dieses wurde in sechs Portionen aliquotiert, an die separat die Reste des Linkersegments gekuppelt wurden. Nach der Abspaltung vom Harz wurden die erhaltenen Peptide (allgemeine Struktur **107**) weiter zu den finalen Inhibitoren umgesetzt. Die Überführung der Ornithin-Reste in Arginine erfolgte gleichzeitig mit der Überführung des P1-Amins in ein Guanidin (vgl. Schema 3.3, S.127).

Die Inhibitoren **C-124** bis **C-126** wurden ebenfalls ausgehend von einem gemeinsamen Vorläufer, dem harzgebundenen Tripeptid **108**, synthetisiert (Schema 3.17). Als Vorläufer des P5-Arginins bzw. P5-D-Arginins wurden Fmoc-Orn(Boc)-OH bzw. Fmoc-D-Orn(Boc)-OH eingesetzt. Nach der Kupplung der Linkerreste wurde das Peptid der allgemeinen Formel **109** erhalten, das dann jeweils zu den finalen Inhibitoren umgesetzt wurde. Die Überführung der Ornithin-Reste in Arginine erfolgte gleichzeitig mit der Überführung des P1-Amins in ein Guanidin (vgl. Schema 3.3, S.127).

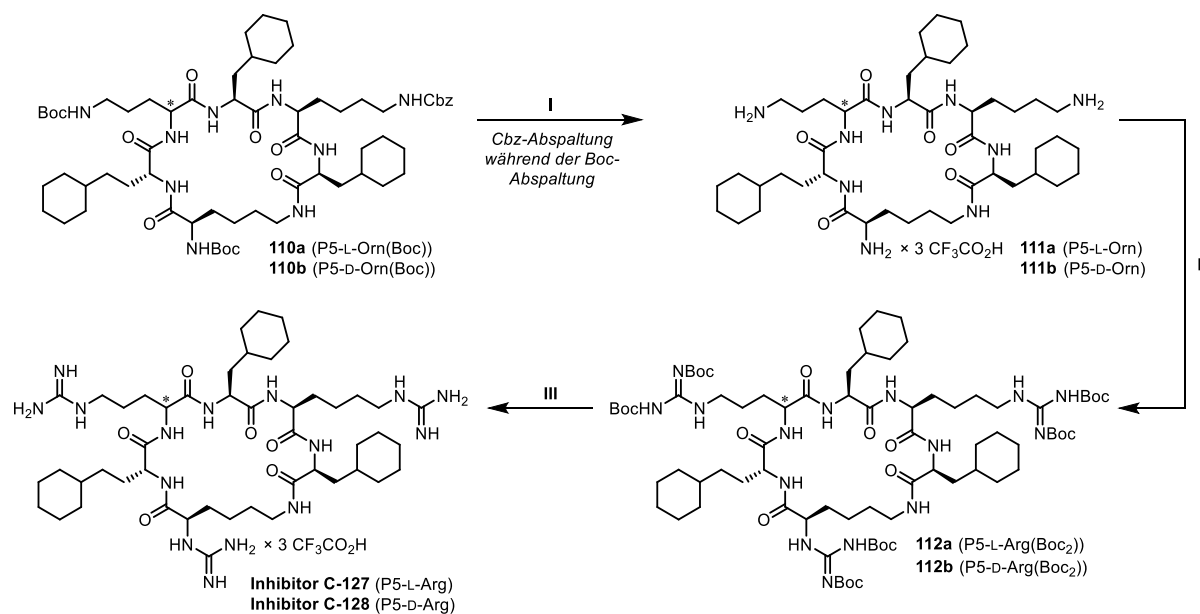


Schema 3.16 Synthese der potentiell zellpenetrierenden Inhibitoren **C-119** bis **C-123**. (I) und (II) Harzbeladung und Festphasenpeptidsynthese analog zur Synthese der Leitstruktur **42** (vgl. Schema 3.1, S.123).



Schema 3.17 Synthese der Inhibitoren **C-124** bis **C-126**. (I) und (II) Harzbeladung und Festphasenpeptidsynthese analog zur Synthese der Leitstruktur **42** (vgl. Schema 3.1, S.123).

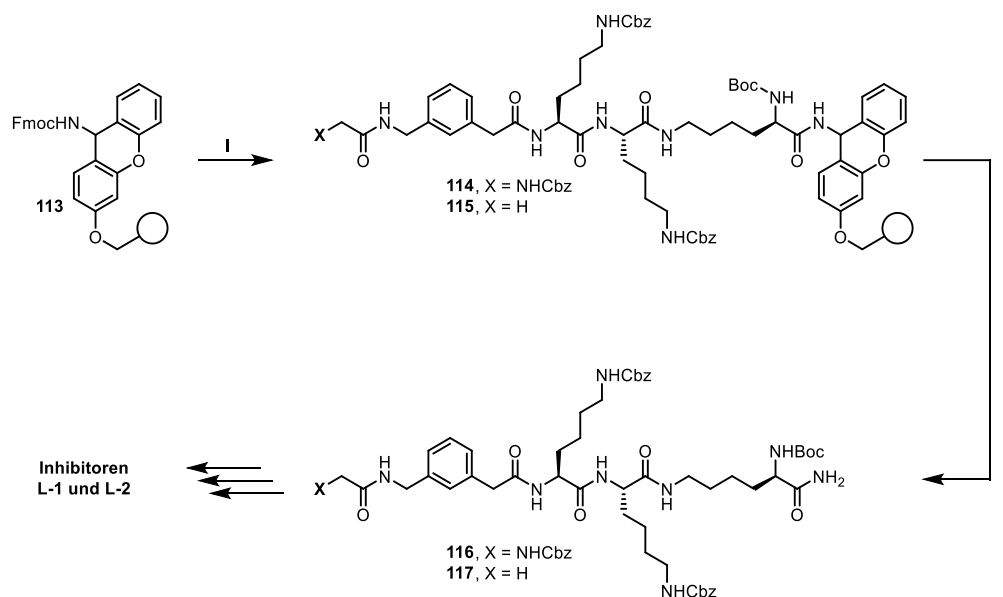
Die Inhibitoren **C-127** und **C-128** mit Homoarginin als P3-Rest sollten ursprünglich Lysin als P3-Rest enthalten. Die Synthese wurde daher analog zu der in Schema 3.17 gezeigten Route begonnen. Im Zuge der Boc-Abspaltung von den Intermediaten **110a** und **110b** wurde jeweils die Cbz-Schutzgruppe des P3-Lysins mit abgespalten (Schema 3.18, S.140). Dennoch wurden die so erhaltenen Verbindungen (**111a,b**) weiter zu den guanylierten Intermediaten **112a** und **112b** und anschließend zu den Inhibitoren **C-127** bzw. **C-128** umgesetzt.



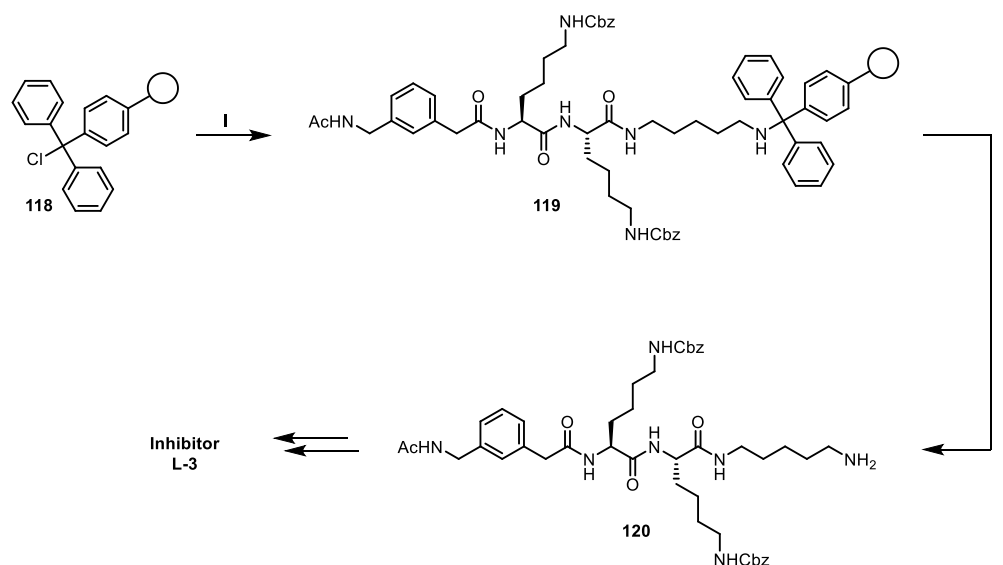
Schema 3.18 Synthese der Inhibitoren **C-127** und **C-128**. (I) 4 M HCl in 1,4-Dioxan, Fällung aus Et₂O, präparative HPLC; (II) 9,0 Äq. *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin, 15,0 Äq. DIPEA, DMF, 48 h; (III) 32 % HBr in AcOH, 2 h, Fällung aus Et₂O, präparative HPLC.

3.9.8 Synthese linearer Referenzverbindungen

Die Referenzverbindung **54** wurde von D. ROGGE (AG STEINMETZER) synthetisiert.¹²² Die Synthese der Verbindungen **L-1** und **L-2**, die jeweils ein Carbonsäureamid als C-terminale Gruppe tragen, erfolgte zunächst an einem Sieber-Amid-Harz und zwei anschließenden Schritten in Lösung (Schema 3.19): Im ersten Schritt wurde die Fmoc-Schutzgruppe eines Fmoc-Sieber-Amid-Harzes (**119**) durch Behandlung mit 20 % Piperidin in DMF (V/V) abgespalten. Anschließend wurden Boc-D-Lys(Fmoc)-OH, zweimal Fmoc-Lys(Cbz)-OH und Fmoc-3-Amphac-OH analog zur Synthese der Leitstruktur gekuppelt (vgl. Schema 3.1, S.123). Als letzter Rest wurde Cbz-Gly-OH bzw. AcOH gekuppelt, wonach die harzgebundenen Peptide **114** bzw. **115** erhalten wurden. Diese wurden jeweils durch Behandlung mit 1 % TFA in DCM (V/V) vom Harz abgespalten. Die Boc-Schutzgruppen der Peptide **116** und **117** wurden analog zur Synthese der Leitstruktur abgespalten, worauf folgend die freie Aminogruppe in ein zweifach Boc-geschütztes Guanidin überführt wurde. Im finalen Schritt wurden die Schutzgruppen mit 32 % HBr in AcOH abgespalten. Die Synthese des Inhibitors **L-3** mit Homoagmatin als P1-Rest erfolgte ausgehend von einem Tritylchlorid-Harz (**118**; Schema 3.20). Dieses wurde im ersten Schritt mit Cadaverin beladen, gefolgt von der sukzessiven Kupplung der weiteren Reste bis hin zum harzgebundenen Peptid **119**. Beladene Trityl-Harze sind säureempfindlicher als beladene 2-Chlortrityl-Harze, weshalb eine Abspaltung des Peptids **120** unter mild-sauren Bedingungen mit 1 % TFA in DCM (V/V) möglich war.²⁴⁰ Die Aminogruppe des Peptids **120** wurde in ein zweifach Boc-geschütztes Guanidin überführt; nach finaler Abspaltung der Schutzgruppen wurde der Inhibitor **L-3** erhalten.



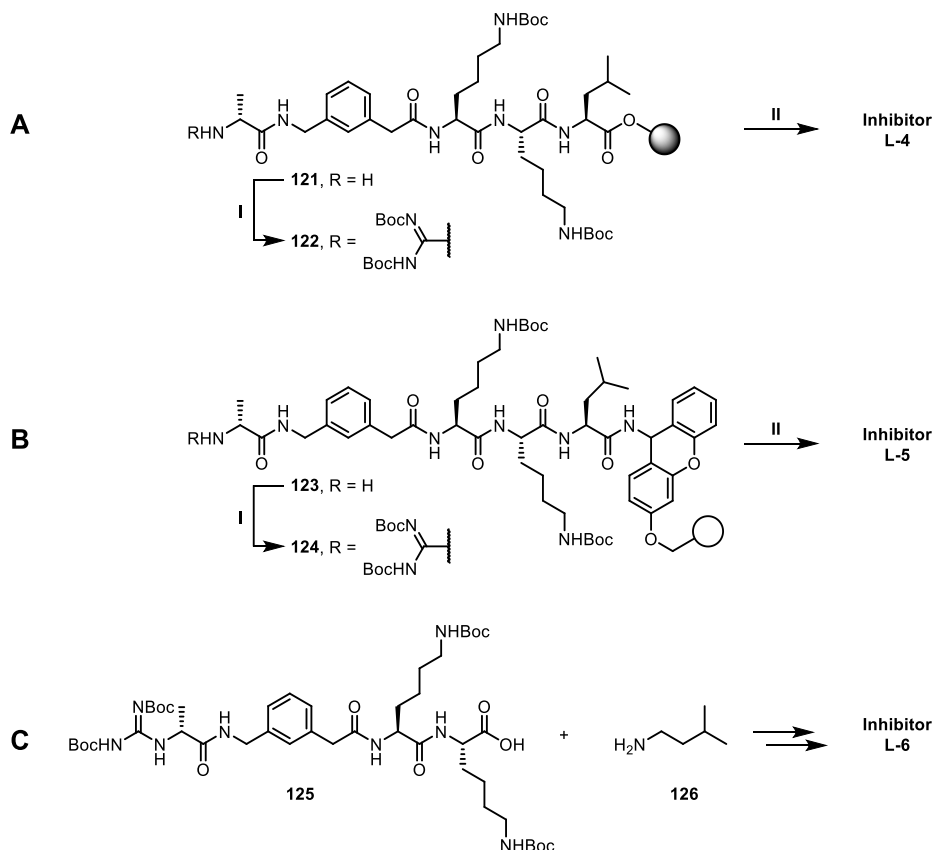
Schema 3.19 Synthese der linearen Referenzverbindungen **L-1** und **L-2** an einem Sieber-Amid-Harz. (I) Fmoc-Abspaltung und anschließende Festphasenpeptidsynthese analog zur Synthese der Leitstruktur **42** (vgl. Schema 3.1, S.123). (II) 1 % TFA in DCM (V/V), 4 × 30 min, Neutralisierung der isolierten Abspaltung nach jeweils 30 min mit DIPEA.



Schema 3.20 Synthese der linearen Referenzverbindung **L-3** mit C-terminalem Homoagmatin. (I) 6,0 Äq. Cadaverin, DCM, 2 h; dann Festphasenpeptidsynthese analog zur Synthese der Leitstruktur **42** (vgl. Schema 3.1, S.123). (II) 1 % TFA in DCM (V/V), 4 × 30 min, Neutralisierung der isolierten Abspaltung nach jeweils 30 min mit DIPEA.

Die Referenzverbindungen **L-4** mit C-terminalem Leucin und **L-5** mit C-terminalem Leucinamid wurden zur Gänze an der festen Phase synthetisiert; **L-4** wurde an einem 2-Chlortrityl-Harz, **L-5** an einem Sieber-Amid-Harz hergestellt (Schema 3.21A, B; S.142). Nach sukzessiver Kupplung der Reste und Fmoc-Abspaltung vom N-terminalen D-Alanin wurden die harzgebundenen Peptide **121** bzw. **123**

erhalten. Deren *N*-terminale Aminogruppen wurden jeweils an der festen Phase in ein zweifach Boc-geschütztes Guanidin überführt (**122**, **124**). Bei der folgenden Abspaltung vom Harz mit TFA/TIS/H₂O (95:2,5:2,5, V/V/V) wurden simultan alle Boc-Schutzgruppen abgespalten. Nach anschließender Reinigung mittels präparativer HPLC wurden die Inhibitoren **L-4** bzw. **L-5** isoliert. Zur Synthese des Inhibitors **L-6** wurde an der festen Phase das geschützte Peptid **125** synthetisiert. Dieses wurde anschließend mit HATU und DIPEA an Isopentylamin (**126**) gekuppelt und dann durch Abspaltung der Schutzgruppen zum finalen Inhibitor umgesetzt (Schema 3.21C).

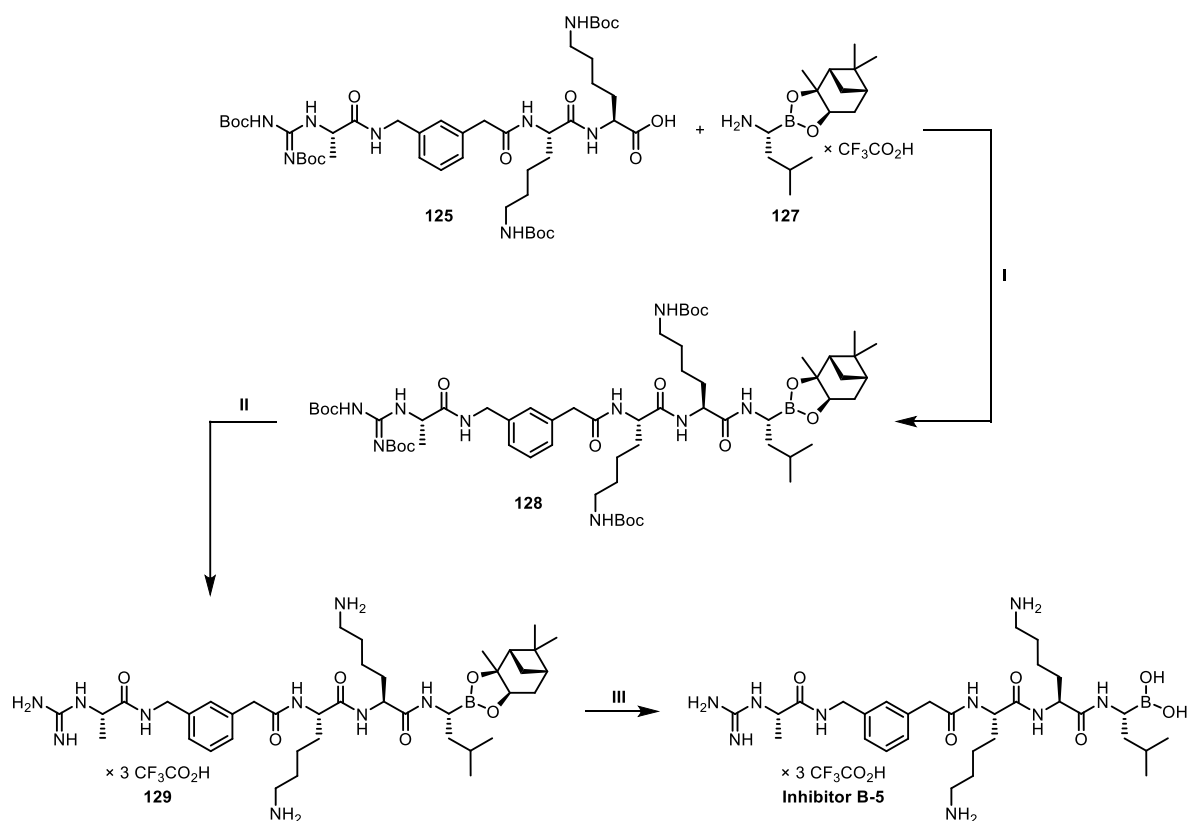


Schema 3.21 Synthese der linearen Referenzverbindungen **L-4** bis **L-6**. (I) 3,0 Äq. *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin, 6,0 Äq. DIPEA, DMF, 18 h; (II) TFA/TIS/H₂O (95:2,5:2,5, V/V/V), 3 h, dann präparative HPLC.

3.9.9 Synthese Boroleucin-basierter Inhibitoren

Bei der Herstellung der Inhibitoren **B-1** bis **B-8** wurden zunächst lineare Vorläuferpeptide synthetisiert, die dann in Lösung weiter umgesetzt wurden. Im Folgenden sei die Synthese des Inhibitors **B-5** erläutert (Schema 3.22); die Synthese der übrigen Boroleucin-basierten Inhibitoren erfolgte analog. Als linearer Vorläufer des Inhibitors **B-5** wurde das Peptid **125** eingesetzt, das bereits als Vorstufe des Inhibitors **L-6** diente (vgl. Schema 3.21). Das Peptid **125** wurde mit kommerziell erhältlichem Boroleucin-Pinandiolester **127** (als TFA-Salz) zum Intermediat **128** umgesetzt. Aminoboronsäuren und deren Ester neigen unter basischen Bedingungen zur Protodeborylierung.²⁴¹⁻²⁴² Um diese unerwünschte

Nebenreaktion zu unterdrücken, wurde die Carbonsäurefunktion des Intermediats **125** mit HATU und DIPEA voraktiviert und der Boroleucin-Pinandiolester **127** erst nach 15 Minuten zugegeben. Dennoch wurde die Protodeborylierung als Nebenreaktion beobachtet. Als weitere Nebenreaktion trat die Epimerisierung des Stereozentrums des P2-Lysins auf. Nach der Abspaltung der Boc-Gruppen von **128** konnten die Nebenprodukte mittels präparativer HPLC abgetrennt und das Peptid **129** isoliert werden. Zum Teil wurde während der Boc-Abspaltung auch die Spaltung des Pinandiolesters beobachtet. Im letzten Schritt wurde die Pinandiol-Schutzgruppe durch Umesterung auf Isobutylboronsäure²⁴² abgespalten, wodurch nach Reinigung mittels präparativer HPLC der Inhibitor **B-5** erhalten wurde.



Schema 3.22 Synthese des Inhibitors **B-5**. Die Synthese der übrigen Boroleucin-basierten Inhibitoren erfolgte analog. (I) 1,15 Äq. HATU, 4,0 Äq. DIPEA, DMF, 1 h. (II) 4 M HCl in 1,4-Dioxan, Fällung aus Et₂O, präparative HPLC. (III) 2,0 Äq. Isobutylboronsäure, 1 M HCl, MeOH, Pentan, 18 h, präparative HPLC.

Die Inhibitoren **B-1** bis **B-8** wurden wie die übrigen Inhibitoren massenspektrometrisch charakterisiert. Üblicherweise werden in der ESI⁺-Massenspektrometrie die Signale des an H⁺, NH₄⁺, Na⁺ oder K⁺ gebundenen Inhibitors detektiert, wobei auch Signale von an mehrere Kationen gebundenen Inhibitor-molekülen möglich sind. In den Massenspektren von **B-1** bis **B-8** wurden zusätzlich die Signale von Kondensationsprodukten detektiert. Außerdem wurden Signale von methylierten Spezies gefunden. Bei den methylierten Verbindungen handelt es sich wahrscheinlich um Methyl- bzw. Dimethylboronsäureester, die im Zuge der Messung der Massenspektren gebildet wurden (Methanol

4 Zusammenfassung

Flavivirin ist der proteolytisch aktive Komplex aus den viralen Proteinen NS2B und NS3. Flavivirin ist eine Serinprotease mit trypsinähnlicher Substratspezifität und an der Prozessierung des Polyproteins aller *Flavivirus*-Spezies beteiligt. Da die Prozessierung des Polyproteins für die *Flavivirus*-Vermehrung essentiell ist, gilt Flavivirin als Zielstruktur für die Entwicklung antiviraler Wirkstoffe.

Die Verbindung **42** (Abb. 4.1, S.148) ist ein in der AG STEINMETZER entwickelter cyclischer Inhibitor des Flavivirins. Die Hemmwirkung auf das Flavivirin des Zika- („ZIKV-Protease“), des West-Nil- („WNV-Protease“) und des Dengue-4-Virus („DENV4-Protease“) liegt *in vitro* im nanomolaren Bereich. Dennoch zeigt der Inhibitor **42** in Zellkultur nur einen geringen Effekt auf die ZIKV-Vermehrung. Die vorliegende Arbeit wurde unter der Prämisse angegangen, dass für diese Diskrepanz zwischen starker Hemmwirkung *in vitro* und geringer Wirksamkeit *in cellulo* die niedrige Zellpermeabilität des Inhibitors **42** verantwortlich ist. Die niedrige Zellpermeabilität ergibt sich aus der Substratanalogie, also dem polaren, peptidischen Charakter mit drei positiv geladenen Gruppen in P3-, P2- und P1-Position. Daher sollte untersucht werden, inwieweit sich die polaren Gruppen durch ungeladene, idealerweise lipophile Reste ersetzen lassen.

Um solche Modifizierungsmöglichkeiten der Leitstruktur zu identifizieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit 98 Derivate des Inhibitors **42** hergestellt und enzymkinetisch mit der ZIKV- und der WNV-Protease charakterisiert. Dabei wurde systematisch im Vergleich zur Leitstruktur **42** jeweils nur eine Position oder funktionelle Gruppe verändert, um den Effekt jeder Modifikation nachvollziehen zu können. Alle 98 einzelmodifizierten Derivate zeigen, wie der Inhibitor **42**, ein kompetitives Hemmverhalten. Wesentlich unterstützt wurde die SAR-Studie durch S. HUBER und die AG LUO (NTU Singapur), die insgesamt 23 Kristallstrukturen einzelmodifizierter Inhibitoren im Komplex mit der ZIKV-Protease bestimmen konnten. Entsprechend war ein strukturbasiertes Inhibitor-design möglich.

Folgende Modifizierungsmöglichkeiten wurden identifiziert (Abb. 4.1): In P₀-Position ist der Einbau hydrophober D-Aminosäuren ohne nennenswerten Affinitätsverlust möglich. Der 3-Aminomethylphenyllessigsäure-Rest (3-Amphac) in P4-Position lässt sich durch verschiedene Kombinationen aus Glycin, β -Alanin und hydrophoben D-Aminosäuren ersetzen. Das P3-Lysin kann durch basische, hydrophobe oder polare nicht-basische Aminosäuren ersetzt werden. Beim Einbau nicht-basischer Reste sinkt die Hemmwirkung auf Flavivirin *in vitro* allerdings um einen Faktor zwischen 5 und 20. Beim P2-Lysin ist nur der Austausch gegen basische Reste wie Arginin oder 3-Aminomethylphenylalanin möglich, beim Einbau nicht-basischer Reste in die P2-Position sinkt die Affinität zum Flavivirin um mehrere Größenordnungen. Eine sinnvolle Alternative zum guanylierten, über die Seitenkette verknüpften D-Lysin in P1-Position wurde in dieser Arbeit nicht identifiziert.

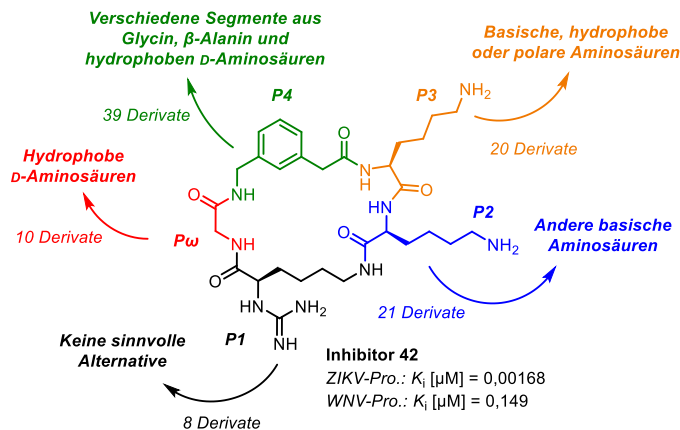


Abbildung 4.1 Ausgehend vom Inhibitor **42** als Leitstruktur wurden 98 einzelmodifizierte Derivate hergestellt. Durch enzymkinetische Untersuchung dieser Derivate wurden die angegebenen, alternativen Reste bzw. Segmente als sinnvoll für weitere Optimierungen identifiziert.

Besonders hervorzuheben unter den einzelmodifizierten Derivaten sind die Inhibitoren **C-8**, **C-14** und **C-73** (Abb. 4.2). Beim Inhibitor **C-8** gelang durch Einbau von D-Homocyclohexylalanin als P_{ω} -Rest ohne nennenswerten Affinitätsverlust eine deutliche Erhöhung der Lipophilie. Beim Inhibitor **C-14** wurde durch Verwendung eines Gly- β -Ala-Segments anstelle des 3-Amphac-Rests eine Steigerung der Affinität zur WNV-Protease um den Faktor 2 erreicht. Durch Verwendung von 3-Aminomethylphenylalanin als Lysin-Mimetikum (**C-73**) gelang, wiederum ohne signifikanten Affinitätsverlust, eine deutliche Senkung der Basizität in P2-Position.

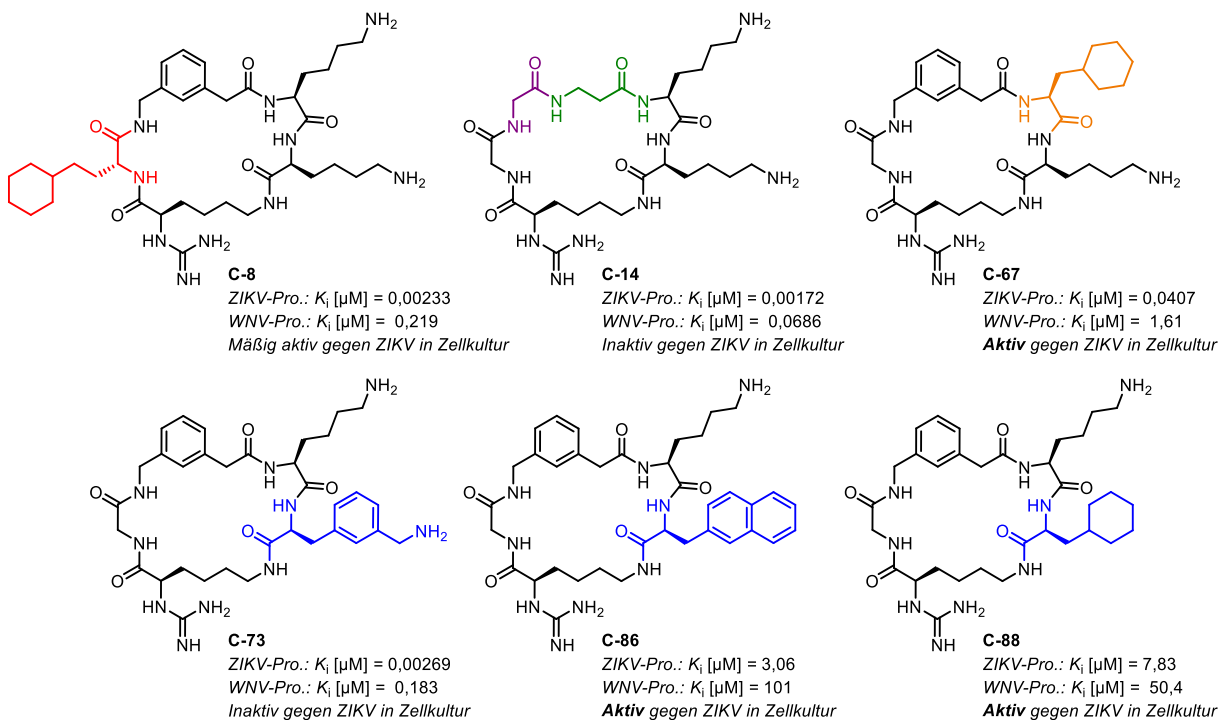


Abbildung 4.2 Einige cyclische Flavirininhibitoren, die in dieser Arbeit entwickelt wurden. Im Vergleich zur Ausgangsverbindung **42** wurde jeweils nur ein Rest modifiziert.

In Untersuchungen *in cellulo* durch D. BENDER und R.O. MURRA (AG HILDT, Paul-Ehrlich-Institut, Langen) wurde für keine der einzelmodifizierten Verbindungen eine höhere Hemmung der ZIKV-Vermehrung als für die Leitstruktur **42** bestimmt (Abb. 4.3); für einige Verbindungen (z.B. **C-67**, **C-86** und **C-88**, s. Abb. 4.2) wurde allerdings eine ähnlich starke Hemmwirkung ermittelt. Dies ist insofern erstaunlich, als dass die Hemmwirkung *in vitro* und die antivirale Aktivität *in cellulo* nicht korrelieren.

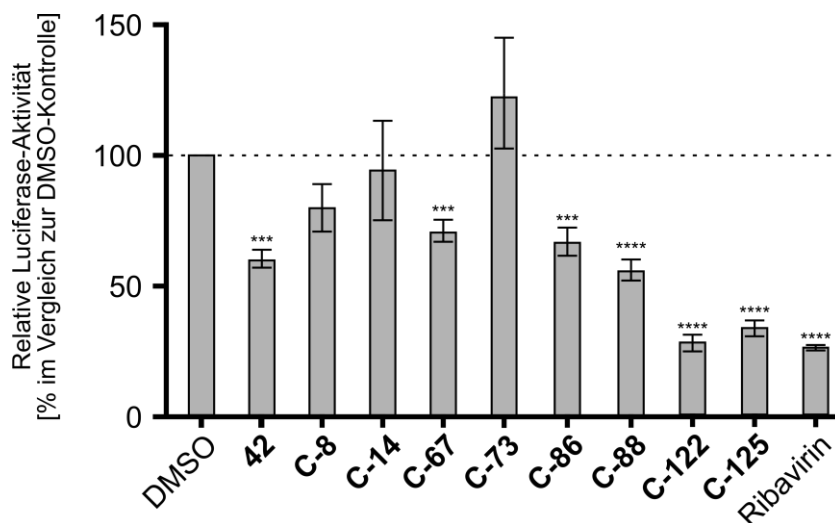


Abbildung 4.3 Untersuchung des antiviralen Effekts der oben gezeigten Inhibitoren mit einem ZIKV-Luciferase-Reporter-Virus (A549-Zellen mit Inhibitor (**C-8**: 20 μ M; übrige Inhibitoren: 40 μ M) bzw. Ribavirin (100 μ M), Auswertung 48 h p.i.; für Details s. Kap. 3.7, S.109 ff.).

Auf Basis der SAR-Studie einzelmodifizierter Derivate wurden zwei Serien kombinierter Inhibitoren synthetisiert: In der ersten Serie wurden 20 Inhibitoren mit einer möglichst hohen Lipophilie hergestellt. Auf diese Weise sollten Verbindungen mit einer im Vergleich zur Ausgangsverbindung **42** erhöhten Membranpermeabilität erhalten werden. In der zweiten Serie wurden 10 Inhibitoren in Anlehnung an cyclische zellpenetrierende Peptide entwickelt. Alle Inhibitoren dieser zweiten Serie zeigen eine Abweichung vom kompetitiven Hemmmodus, weshalb für diese Verbindungen IC_{50} - und keine K_i -Werte angegeben sind. Von vier dieser Inhibitoren wurden von S. HUBER Kristallstrukturen im Komplex mit der ZIKV-Protease bestimmt.

Einige Beispiele kombinierter Derivate sind in Abbildung 4.4 (S.150) gezeigt. Die Untersuchung der lipophilen Inhibitoren wie **C-108** und **C-111** *in cellulo* stand beim Verfassen dieser Arbeit noch aus. Für die Inhibitoren, die in Anlehnung an zellpenetrierende Peptide entwickelt wurden, wurde in Zellkultur-Experimenten im Vergleich zur Ausgangsverbindung **42** eine deutliche Steigerung der antiviralen Wirkung beobachtet: Die Verbindungen **C-122** und **C-125** hemmen bei einer Konzentration von 40 μ M die Virusvermehrung ähnlich effektiv wie Ribavirin bei einer Konzentration von 100 μ M.

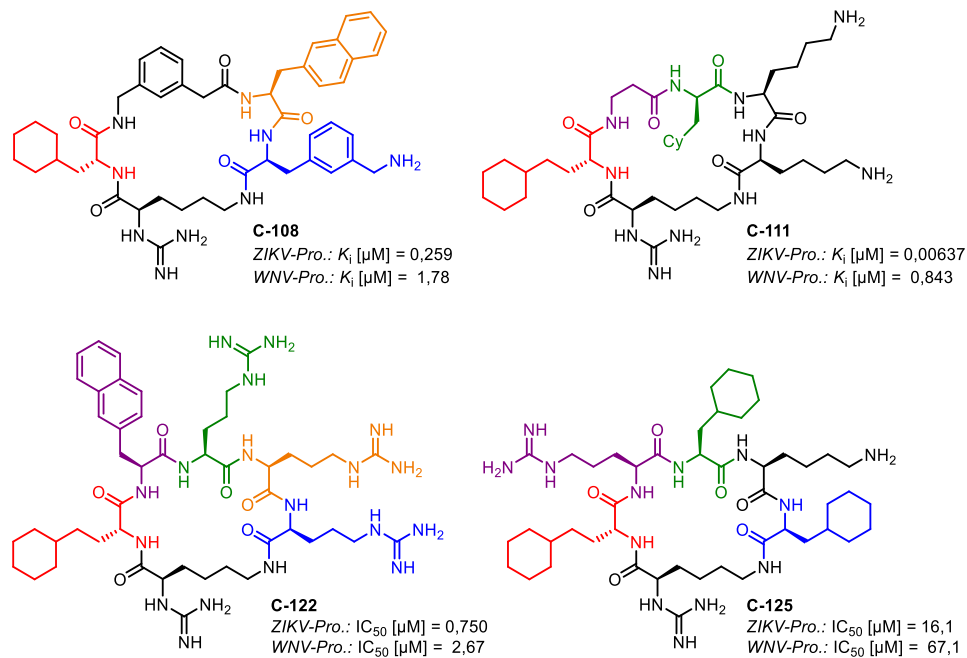
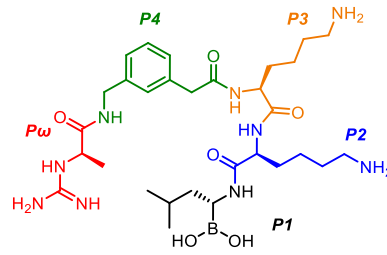


Abbildung 4.4 Beispiele für kombinierte Derivate: **C-108** und **C-111** wurden auf eine möglichst hohe Lipophilie bei gleichzeitig möglichst hoher Flavivirinaffinität optimiert. **C-122** und **C-125** wurden in Anlehnung an zellpenetrierende Peptide entwickelt und zeigen eine ähnlich hohe Aktivität gegen die ZIKV-Vermehrung *in cellulo* wie Ribavirin (vgl. Abb. 4.3).

Des Weiteren wurde für die einzelmodifizierten und die kombinierten Derivate eine hohe Selektivität für Flavivirin ermittelt: Die Serinproteasen Trypsin, Thrombin und Faktor Xa, die wie Flavivirin bevorzugt hinter Sequenzen mit basischen Resten schneiden, werden um mindestens eine Größenordnung weniger effektiv gehemmt als Flavivirin. Die Selektivität ist allerdings in der Regel bei den einzelmodifizierten Derivaten höher als bei den kombinierten.

Zuletzt wurde eine Serie von acht acyclischen, kovalenten Flavivirininhibitoren hergestellt und charakterisiert. Diese Verbindungen wurden von den cyclischen Inhibitoren abgeleitet und besitzen ein Boroleucin als P1-Rest. Vom potentesten Inhibitor dieser Serie (**B-5**, Abb. 4.5) wurde der kovalente Bindungsmodus durch Bestimmung einer Kristallstruktur im Komplex mit der ZIKV-Protease bestätigt (Röntgenstrukturanalyse durch S. HUBER, AG STEINMETZER). Der Inhibitor **B-5** ist der erste bekannte kovalente Inhibitor der ZIKV-Protease mit einem K_i -Wert < 10 nM.

Insgesamt gelang in dieser Arbeit die Synthese und Charakterisierung zahlreicher, *in vitro* sehr potenter Inhibitoren der ZIKV-Protease. Durch Entwicklung der Analoga zellpenetrierender Peptide konnte auch die Hemmwirkung auf die ZIKV-Vermehrung *in cellulo* verbessert werden. Interessant wäre es, die Hemmwirkung auf die Vermehrung des West-Nil-Virus und weiterer Flaviviren *in cellulo* zu untersuchen. *In vitro* besteht eine klare Korrelation zwischen der Inhibierung der ZIKV- und der WNV-Protease (Abb. 4.6).



Inhibitor B-5
 ZIKV-Pro.: K_i [μM] = 0,00796
 WNV-Pro.: K_i [μM] = 3,82

Abbildung 4.5 Der in dieser Arbeit entwickelte Inhibitor **B-5** bindet reversibel-kovalent an das Serin der katalytischen Triade des Flavivirins.

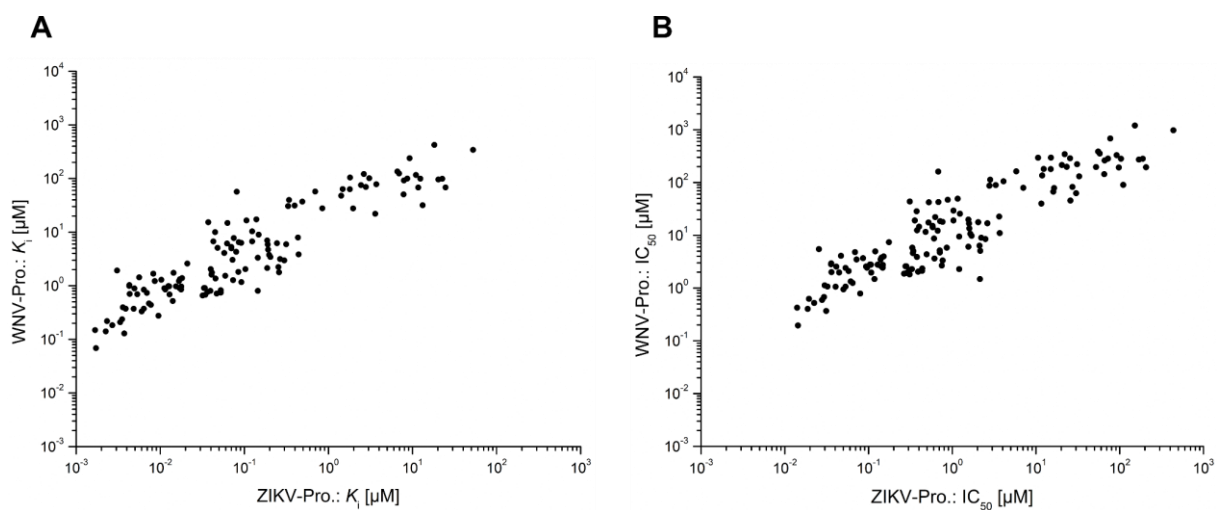


Abbildung 4.6 Korrelation zwischen den K_i - (A) bzw. IC_{50} -Werten (B) der in dieser Arbeit entwickelten Inhibitoren. Trotz einigen Abweichungen sind die Tendenzen der Hemmwerte für die ZIKV- und die WNV-Protease ähnlich. (A) $N = 150$; (B) $N = 164$.

Sollte auch *in cellulo* eine vergleichbare Korrelation bestehen, so könnte ausgehend von dem in dieser Arbeit behandelten Inhibitor typ die Entwicklung pan-antiflaviviraler Inhibitoren erfolgen. Sollten sich die mit dem Zika-Virus bzw. dessen Protease erzielten Ergebnisse auf andere Flaviviren übertragen lassen, so könnte das in dieser Arbeit verwendete Proteasekonstrukt (die binäre ZIKV-Protease „bZiPro“) auch als Modellsystem für die Entwicklung anderer Inhibitor typen dienen: Die hohe proteolytische Aktivität und die hohe Stabilität der Protease erlauben eine einfache und effiziente enzymkinetische Charakterisierung neuer Inhibitoren; das etablierte Kristallisationsprotokoll eröffnet außerdem den Zugang zu einem grundlegenden Verständnis der Struktur-Wirkungs-Beziehungen.

5 Material und Methoden

5.1 Allgemeines

Lösungsmittel, Reagenzien, geschützte Aminosäuren und Harze für die Festphasenpeptidsynthese wurden von *Acros Organics* (Dreieich), *Alfa Aesar* (Kandel), *Bachem Distribution Services GmbH* (Weil am Rhein), *BLDPharm* (Kaiserslautern), *Carbolution Chemicals GmbH* (St. Ingbert), *ChemPur Feinchemikalien und Forschungsbedarf GmbH* (Karlsruhe), *Thermo Fisher Scientific GmbH* (Dreieich), *Iris Biotech GmbH* (Marktredwitz), *Merck KGaA* (Darmstadt), *Carl Roth GmbH & Co. KG* (Karlsruhe) oder *VWR International GmbH* (Darmstadt) bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Zu synthetischen und analytischen Zwecken wurde ausschließlich demineralisiertes Wasser eingesetzt. Zur Lyophilisierung, für die analytische und präparative HPLC sowie für enzymkinetische Messungen wurde Reinstwasser verwendet, das durch Reinigung von demineralisiertem Wasser mit einem Nowapure Select-System (*KSN Wassertechnik*, Nistertal) erhalten wurde.

Synthesen in Lösung wurden in gläsernen Rundkolben durchgeführt und mithilfe eines Magnetrührers und eines Magnetührstäbchens gerührt. Die Kontrolle des Reaktionsfortschritts erfolgte mit analytischer HPLC oder, falls das zu erwartende Produkt unter HPLC-Bedingungen instabil war, mit Massenspektrometrie. Festphasenpeptidsynthesen erfolgten unter ständigem Schütteln in verschließbaren, mit Filterfritten (aus Glas oder PTFE) ausgestatteten Glas- oder Polycarbonatreaktionsgefäßen. Alle Reaktionen wurden, wenn nicht in der zugehörigen Vorschrift anders vermerkt, bei Umgebungstemperatur durchgeführt.

Solche Reaktion, die bedingt durch die Anwesenheit wasser- oder luftempfindlicher Substanzen ein Arbeiten unter Schutzgas notwendig machten, wurden mittels SCHLENK-Technik unter Argon in ausgeheizten Glasapparaturen durchgeführt. Dafür wurde eine Wechselhahnanlage mit Drehschiebervakuumpumpe (*vacuubrand RZ2.5*) und zwischengeschalteter Kühlfalle (gekühlt durch flüssigen Stickstoff) eingesetzt. Für o.g. Reaktionen wurden kommerziell erhältliche Lösungsmittel der Qualitätsstufe „extra dry“ eingesetzt. Sofern unter Schutzgasatmosphäre gearbeitet wurde, ist dies in der zugehörigen Versuchsvorschrift vermerkt.

Chromatographie. Als stationäre Phase für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (Korngröße 40-63 µm) des Herstellers *Merck* verwendet. Die mobile Phase wurde je nach Trennproblem ausgewählt und ist für jede Trennung gesondert angegeben. Die stationäre Phase wurde als Suspension mit der mobilen Phase in die Säule eingebracht und unter Luftdruck verdichtet. Sodann wurde das aufzutrennende Substanzgemisch in einem möglichst kleinen Volumen der mobilen Phase gelöst und auf die Säulenoberfläche aufgetragen. Eluiert wurde bei leichtem Überdruck (< 1 bar) bei Umgebungstemperatur. Die Detektion erfolgte mit Dünnschichtchromatographie auf DC-Fertigfolien

(ALUGRAM Xtra SIL G/UV₂₅₄; Schicht: 0,20 mm Kieselgel 60 mit Fluoreszenz-Indikator UV₂₅₄) des Herstellers *Macherey-Nagel* (Düren). Detektiert wurde durch Fluoreszenzlöschung unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) oder durch Anfärbung mit einer Kaliumpermanganat-Färbelösung (1,5 g Kaliumpermanganat, 10 g Kaliumcarbonat, 1,25 mL Natronlauge (10 %), 200 mL Wasser). In letzterem Falle wurde die DC-Fertigfolie bis zur Farbreaktion mit einem Heißluftgebläse erwärmt.

HPLC-Experimente im analytischen Maßstab wurden auf einer *Primaide*-Anlage (*Hitachi Europe*, Düsseldorf; Primaide 1110 Pumpenmodul, 1210 Autoinjektor, 1310 Säulenofen, 1410 Diodenarray-Detektor; Säule: NUCLEODUR C₁₈ ec, 5 μm , 100 Å, 4,6 mm \times 250 mm, *Macherey-Nagel*) bei einer Säulentemperatur von 30,0 °C durchgeführt. Als Elutionsmittel dienten 0,1 % TFA in Wasser (Laufmittel A) und 0,1 % TFA in Acetonitril (Laufmittel B), wobei ein linearer Gradient mit einer Erhöhung des B-Anteils von 1 % Laufmittel B/min und eine Flussrate von 1 mL/min benutzt wurden. Das Startverhältnis von Laufmittel A zu Laufmittel B ist für alle gezeigten Chromatogramme bzw. alle Retentionszeiten jeweils angegeben. Die UV-Detektion erfolgte bei 220 nm. Zur besseren Vergleichbarkeit der HPLC-Daten sind in der Regel nicht die Retentionszeiten angegeben, sondern der Anteil an Laufmittel B in der Pumpe („% B“), bei dem das Produktsignal detektiert wurde. Der Zahlenwert des % B-Werts entspricht bei den oben angegebenen Bedingungen der Summe aus dem Zahlenwert der Retentionszeit in Minuten und dem Zahlenwert des prozentualen Startanteils an Laufmittel B (Beispiel: Eine Retentionszeit von 19 min bei einem Lauf, der bei 10 % B gestartet wurde, entspricht 29 % B).

HPLC-Experimente im präparativen Maßstab wurden auf einer *Varian*-Anlage (Pumpen: Varian PrepStar model 218 gradient system; Detektor: ProStar model 320; Fraktionssammler: Varian model 701) oder auf einer Anlage von *Knauer* (Berlin; Knauer Azura P 2.1L mit Pumpenkopf E4099AB und HyperShear statischer Mischkammer; Detektor: Knauer UVD 2.1L; Fraktionssammler: Foxy R1) bei Umgebungstemperatur durchgeführt; mit beiden Anlagen wurden C₁₈-Säulen (NUCLEODUR C₁₈ ec, 5 μm , 100 Å, 32 mm \times 250 mm, *Macherey-Nagel*) mit Vorsäule (NUCLEODUR 100-5 C₁₈ ec, 32 mm \times 15 mm, *Macherey-Nagel*) verwendet. Als Elutionsmittel dienten 0,1 % TFA in Wasser (Laufmittel A) und 0,1 % TFA in Acetonitril (Laufmittel B), wobei ein linearer Gradient mit einer Erhöhung des B-Anteils von 0,5 % Laufmittel B/min und eine Flussrate von 20 mL/min angewendet wurden. Die zu reinigende Probe wurde in einem Gemisch aus den Laufmitteln A und B gelöst. Die Zusammensetzung dieses Gemischs wurde derart gewählt, dass die Elution der zu reinigenden Verbindung nach ungefähr 30 bis 40 min zu erwarten war (als Berechnungsgrundlage diente das jeweils zugehörige, analytische HPLC-Chromatogramm). Die UV-Detektion erfolgte auch hier bei 220 nm.

Gefriertrocknung von Inhibitoren. Gereinigte Inhibitoren wurden vor weiterer Verwendung oder Charakterisierung an einer Gefriertrocknungsanlage (Alpha 2-4 LDplus; *Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen*, Osterode am Harz) aus Wasser oder 80 % *tert*-Butanol in Wasser lyophilisiert. Wegen des TFA-Anteils in den Laufmitteln der präparativen HPLC wurden die Inhibitoren als TFA-Salze erhalten. Zur Berechnung der molaren Masse der TFA-Salze wurde zur molaren Masse der unprotonierten Inhibitoren pro protonierbarer Gruppe die molare Masse eines TFA-Moleküls addiert.

NMR-Spektroskopie. Die Messung von Kernspinresonanzspektren erfolgte durch Mitarbeiter der NMR-Abteilung des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg an einem Spektrometer (Typ ECX400; Messfrequenzen: ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 101 MHz) des Herstellers *Jeol* (Freising) in deuterierten Lösungsmitteln. Die chemische Verschiebung δ ist sowohl für ^1H - als auch für ^{13}C -Spektren in *parts per million* (ppm) relativ zu Tetramethylsilan angegeben. Die Restprotonen des jeweiligen deuterierten Lösungsmittels bzw. dessen ^{13}C -Signal dienten dabei als interner Standard (Referenzsignale in δ [ppm]: Chloroform-*d*: ^1H : 7,26, ^{13}C : 77,2; Dimethylsulfoxid-*d*₆: ^1H : 2,50; ^{13}C : 39,5). Kopplungskonstanten *J* sind in Hz angegeben. Multiplizitäten sind wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, dd = Dublett von Dubletts, dt = Dublett von Triplett, pt = Pseudotriplett, m = Multipllett, br = breites Signal). Die Auswertung erfolgte mit der Software MestReNova.

Massenspektrometrie. Massenspektrometrie-Experimente wurden an einem QTrap 2000 ESI-Massenspektrometer des Herstellers *Life Technologies GmbH* (Darmstadt) von Mitarbeitern der Abteilung für Massenspektrometrie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Die zu untersuchende Probe wurde aus wässriger oder methanolischer Lösung vermessen.

5.2 Enzymkinetische Messungen

Alle enzymkinetischen Messungen erfolgten bei Umgebungstemperatur in schwarzen *96-well*-Platten (FluoroNunc F96 MaxiSorp, *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, Vereinigte Staaten) an einem *Fluoroskan-Ascent*-Plattenlesegerät (*Thermo Fisher Scientific*) bei $\lambda_{\text{ex}} = 355$ nm und $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm mit fluorogenen AMC-Substraten. Pro Messung wurden 40 Messpunkte jeweils im Abstand von 15 s aufgenommen. Die Reaktion wurde immer durch Zugabe des Enzyms gestartet; unmittelbar nach der Zugabe des Enzyms wurde die Platte 10 s geschüttelt und anschließend mit der Messung begonnen. Die *steady-state*-Geschwindigkeiten, d.h. Zunahme des Fluoreszenzsignals im initialen, linearen Bereich der Umsatzkurven in Abwesenheit eines Inhibitors (v_0) und in Gegenwart unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen (v) wurden durch lineare Regression bestimmt. Die Bestimmung von Michaelis-Menten-Konstanten erfolgte durch Messung bei verschiedenen Substratkonzentrationen [S]

und Anpassung der [S], v_0 -Paare an Gleichung (1). Die Bestimmung von K_i - und IC_{50} -Werten erfolgte durch Messung mit acht verschiedenen Inhibitorkonzentrationen [I] bei konstanter Substratkonzentration [S] und Anpassung der [I], v -Paare an Gleichung (2) bzw. Gleichung (3).

$$v_0 = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_M + [S]} \quad (1) \qquad v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_M \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (2) \qquad v = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^p} \quad (3)$$

K_i : Hemmkonstante; K_M : Michaelis-Menten-Konstante; [I]: Inhibitorkonzentration; IC_{50} : Mittlere inhibitorische Konzentration; p: Hill-Koeffizient; [S]: Substratkonzentration; v_0 : Umsatzgeschwindigkeit der ungehemmten Reaktion; V_{\max} : Maximale Umsatzgeschwindigkeit; v: Von [I] abhängige Geschwindigkeit der gehemmten Reaktion.

Zur Anpassung der Messdaten an die Gleichung (2) wurden die acht Inhibitorkonzentrationen [I] in Abhängigkeit von der Hemmwirkung des Inhibitors gewählt (im Ansatz ca. $32 \times IC_{50}$; $16 \times IC_{50}$; $8 \times IC_{50}$; $4 \times IC_{50}$; $2 \times IC_{50}$; $1 \times IC_{50}$; $0,5 \times IC_{50}$; $0,25 \times IC_{50}$). Zur Abschätzung des IC_{50} -Werts wurde vor der eigentlichen Messung ein Vortest durchgeführt, bei dem mit 3-4 verschiedenen Inhibitorkonzentrationen, die einen Konzentrationsbereich von 3-4 Größenordnungen abdeckten, gemessen wurde; aus den dabei bestimmten v konnte der IC_{50} -Wert näherungsweise errechnet werden.

Substratlösungen wurden aus Stammlösungen (10 mM in Wasser) durch Verdünnung mit Wasser hergestellt; Inhibitorlösungen wurden aus Stammlösungen (10 mM in DMSO) durch Verdünnung mit Messpuffer oder DMSO hergestellt. Die Substrat- und Inhibitorstammlösungen wurden bei -20°C gelagert. Pro Inhibitor wurden unabhängig voneinander mindestens drei Stammlösungen hergestellt, aus denen unabhängige Verdünnungsreihen zur Bestimmung von K_i - bzw. IC_{50} -Werten angesetzt wurden. Enzymlösungen in Messpuffer („Messlösungen“) wurden vor jeder Messung frisch aus aliquotierten Stammlösungen angesetzt; Konzentration und Lagerpuffer sind auf den folgenden Seiten für jedes Enzym angegeben. Die Enzymstammlösungen wurden bei -80°C gelagert.

Folgend werden die genauen Bedingungen für jedes Enzym beschrieben.

ZIKV-Protease

Enzym: Binäres Konstrukt nach LUO („bZiPro“); $M = 25$ kDa; hergestellt von Mitarbeitern der AG LUO (Nanyang Technical University, Singapur) bzw. von S. HUBER (AG STEINMETZER).^{121-122,206}

Lagerpuffer: 20 mM HEPES; 150 mM NaCl; 2 mM DTT; 50 g/L Glycerin; pH 7,5.

Messpuffer: 20 mM Tris; 2 mM DTT; 1 g/L Triton X-100; 100 g/L Glycerin; pH 8,5.¹⁴⁸

Enzym-Stammlösung: 1,54 μ M in Lagerpuffer.

Enzym-Messlösung: 15,4 nM in Messpuffer (verdünnt aus der Enzym-Stammlösung).

Substrat: Phac-Leu-Lys-Lys-Arg-AMC (**52**);¹⁴⁴ $K_M = 1,36$ μ M.

Für die Bestimmung von K_M -Werten wurden sechs Ansätze folgender Zusammensetzung gemessen:

125 μ L Messpuffer

50 μ L Substratlösung (80 μ M; 40 μ M; 20 μ M; 10 μ M; 5,0 μ M; 2,5 μ M)

(im Ansatz: 20 μ M; 10 μ M; 5,0 μ M; 2,5 μ M, 1,25 μ M; 0,63 μ M)

25 μ L Enzym-Messlösung (Enzymkonzentration im Ansatz: 1,93 nM).

Für die Bestimmung von K_i - bzw. IC_{50} -Werten setzte sich ein Messansatz wie folgt zusammen:

125 μ L Inhibitor in Messpuffer (acht verschiedene Konzentrationen, abhängig vom Inhibitor)

50 μ L Substratlösung (40 μ M; im Ansatz: 10 μ M)

25 μ L Enzym-Messlösung (Enzymkonzentration im Ansatz: 1,93 nM).

Für die Bestimmung von K_M - und K_i -Werten bei niedrigeren pH-Werten (8,0; 7,5; 7,0) wurde der pH-Wert des Messpuffers mit Salzsäure eingestellt. Die Inhibitorlösungen und die Enzym-Messlösungen wurden mit diesem Puffer angesetzt. Zur Messung bei pH 4,5 wurde der Kristallisationspuffer (2 M Ammoniumsulfat, 0,1 M Natriumacetat, 30 % PEG 2000) benutzt.

Für die k_{cat} -Bestimmung wurde eine Eichmessung mit verschiedenen AMC-Konzentrationen aufgenommen; mittels linearer Regression der Messpunkte wurde der Zusammenhang zwischen AMC-Konzentration und der relativen Fluoreszenz bestimmt (Abb. 5.1, Gleichung (5), S.158). Aus Gleichung (5) konnte mit der bekannten Enzymkonzentration E_0 (1,93 nM) und dem in der jeweiligen Messung bestimmten V_{max} die Wechselzahl berechnet werden.

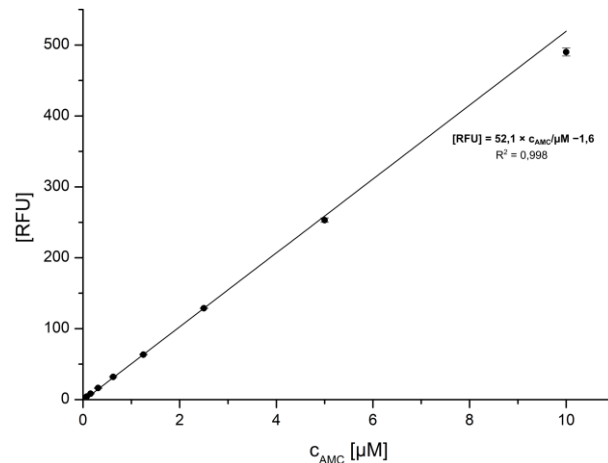


Abbildung 5.1 Kalibriergerade zur Umrechnung der relativen Fluoreszenz in eine AMC-Konzentration (*Fluoroskan-Ascent*-Plattenlesegerät). Der Anstieg der relativen Fluoreszenz um 52,1 Einheiten entspricht einer Zunahme der AMC-Konzentration um 1 µM.

$$k_{\text{cat}} = \frac{v_{\text{max}}}{\Delta_{\text{AMC}} \times E_0} \quad (5)$$

Mit: k_{cat} : Wechselzahl in $[\text{s}^{-1}]$; v_{max} : Max. Umsatzgeschwindigkeit in $[\text{RFU} \times \text{s}^{-1}]$; Δ_{AMC} : Steigung der Kalibriergeraden ($52,1 \text{ RFU} \times \mu\text{M}^{-1}$); E_0 : Enzymkonzentration zu Beginn der Messung (1,93 nM); RFU: Relative Fluoreszenzeinheit.

WNV-Protease

Enzym: Kovalent G₄SG₄-verlinktes Konstrukt nach HILGENFELD; M = 26 kDa; hergestellt von Mitarbeitern der AG HILGENFELD (Universität zu Lübeck) bzw. von S. HUBER (AG STEINMETZER).¹⁴⁴

Lagerpuffer: 25 mM Tris; 50 g/L Glycerin; pH 8,5.

Messpuffer: 100 mM Tris; 1 g/L Triton X-100; 320 g/L Glycerin; pH 8,5.¹⁴⁴

Enzym-Stammlösung: 2,60 µM in Lagerpuffer.

Enzym-Messlösung: 65,0 nM in Messpuffer (verdünnt aus der Enzym-Stammlösung).

Substrat: Phac-Leu-Lys-Lys-Arg-AMC (**52**);¹⁴⁴ $K_M = 54,1 \mu\text{M}$.

Für die Bestimmung von K_M -Werten wurden sechs Ansätze folgender Zusammensetzung gemessen:

125 µL Messpuffer

50 µL Substratlösung (800 µM; 400µM; 200 µM; 100 µM; 50 µM; 25 µM)

(im Ansatz: 200 µM; 100 µM; 50 µM; 25 µM, 12,5 µM; 6,25 µM)

25 µL Enzym-Messlösung (Enzymkonzentration im Ansatz: 8,16 nM).

Für die Bestimmung von K_i - bzw. IC_{50} -Werten setzte sich ein Messansatz wie folgt zusammen:

125 µL Inhibitor in Messpuffer (acht verschiedene Konzentrationen, abhängig vom Inhibitor)

50 µL Substratlösung (400 µM; im Ansatz: 100 µM)

25 µL Enzym-Messlösung (Enzymkonzentration im Ansatz: 8,16 nM).

DENV2-Protease

Enzym: G₄SG₄-verlinktes Konstrukt nach SCHIRMEISTER (Johannes-Gutenberg-Universität Mainz; nicht veröffentlicht); M = 26 kDa; hergestellt von S. HUBER (AG STEINMETZER).

Lagerpuffer: 20 mM Tris×HCl; 50 mM NaCl; 50 g/L Glycerin; pH 7,5.

Messpuffer: 100 mM Tris; 1 g/L Triton X-100; 320 g/L Glycerin; pH 8,5.¹⁴⁴

Enzym-Stammlösung: 3,46 μM in Lagerpuffer.

Enzym-Messlösung: 346 nM in Messpuffer (verdünnt aus der Enzym-Stammlösung).

Substrat: Phac-Lys-Arg-Arg-AMC (**53**);¹⁹⁵ $K_M = 58,8 \mu\text{M}$.

Für die Bestimmung von K_M -Werten wurden sechs Ansätze folgender Zusammensetzung gemessen:

125 μL Messpuffer

50 μL Substratlösung (500 μM; 250 μM; 125 μM; 31,3 μM; 15,6 μM; 7,81 μM)

(im Ansatz: 125 μM; 31,3 μM; 15,6 μM; 7,81 μM; 3,91 μM; 1,95 μM)

25 μL Enzym-Messlösung (Enzymkonzentration im Ansatz: 43 nM).

Für die Bestimmung von K_i - bzw. IC_{50} -Werten setzte sich ein Messansatz wie folgt zusammen:

125 μL Inhibitor in Messpuffer (acht verschiedene Konzentrationen, abhängig vom Inhibitor)

50 μL Substratlösung (400 μM; im Ansatz: 10 μM)

25 μL Enzym-Messlösung (Enzymkonzentration im Ansatz: 43 nM).

Bovines α-Chymotrypsin

Enzym: 350 E/mg, Merck KGaA; M = 25 kDa.

Lagerpuffer: –

Messpuffer: 50 mM Tris; 154 mM; pH 8,0.²⁴⁴

Enzym-Stammlösung: Lagerung als Feststoff bei 4 °C.

Enzym-Messlösung: 8,4 nM in Messpuffer (verdünnt aus der Enzym-Stammlösung).

Substrat: Bzls-D-Arg-Pro-Phe-AMC;²⁴⁵ $K_M = 90,0 \mu\text{M}$.

Ein Messansatz für die Bestimmung der Hemmung bei einer Inhibitorkonzentration von 100 μM setzte sich wie folgt zusammen:

100 μL Inhibitor in Messpuffer (140 μM; im Ansatz: 100 μM)

20 μL Substratlösung (1,4 mM; im Ansatz: 200 μM)

20 μL Enzym-Messlösung (Enzymkonzentration im Ansatz: 1,20 nM).

Für die Bestimmung von K_i - bzw. IC_{50} -Werten setzte sich ein Messansatz wie folgt zusammen:

- 100 μ L Inhibitor in Messpuffer (acht verschiedene Konzentrationen, abhängig vom Inhibitor)
- 20 μ L Substratlösung (1,4 mM; im Ansatz: 200 μ M)
- 20 μ L Enzym-Messlösung (Enzymkonzentration im Ansatz: 1,20 nM).

Bovines Thrombin

Enzym: Konstrukt nach WALSMANN; $M = 34$ kDa; hergestellt von Mitarbeitern der AG STÜRZEBECKER (Friedrich-Schiller-Universität Jena).²⁴⁶

Lagerpuffer: 250 mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 ; 0,5 g/L BSA; pH 6,5.

Messpuffer: 50 mM Tris; 154 mM NaCl; 0,1 g/L Triton X-100; pH 8,0.²⁴⁴

Enzym-Stammlösung: 8,59 μ M in Lagerpuffer.

Enzym-Messlösung: 430 pM in Messpuffer (verdünnt aus der Enzym-Stammlösung).

Substrat: Tos-Gly-Pro-Arg-AMC,²⁴⁴ $K_M = 3,0$ μ M

Ein Messansatz für die Bestimmung der Hemmung bei einer Inhibitorkonzentration von 100 μ M setzte sich wie folgt zusammen:

- 100 μ L Inhibitor in Messpuffer (140 μ M; im Ansatz: 100 μ M)
- 20 μ L Substratlösung (140 μ M; im Ansatz: 20 μ M)
- 20 μ L Enzym-Messlösung (Enzymkonzentration im Ansatz: 61 pM).

Humaner Faktor Xa

Enzym: Faktor Xa (human) 2530PL, 100 IU, 200,35 IU/mg, $M = 46$ kDa.

Lagerpuffer: 154 mM NaCl; 1 g/L BSA.

Messpuffer: 154 mM NaCl; 1 g/L BSA.

Enzym-Stammlösung: 10,9 μ M in Lagerpuffer.

Enzym-Messlösung: 226 pM in Messpuffer (verdünnt aus der Enzym-Stammlösung).

Substrat: Ms-D-Arg-Gly-Arg-AMC,²⁴⁷ $K_M = 50,0$ μ M.

Ein Messansatz für die Bestimmung der Hemmung bei einer Inhibitorkonzentration von 100 μ M setzte sich wie folgt zusammen:

- 100 μ L Inhibitor in Messpuffer (140 μ M; im Ansatz: 100 μ M)
- 20 μ L Substratlösung (140 μ M; im Ansatz: 100 μ M)
- 20 μ L Enzym-Messlösung (Enzymkonzentration im Ansatz: 32 pM).

Humanes Furin

Enzym: Konstrukt nach LINDBERG; M = 74 kDa; hergestellt durch Mitarbeiter der AG LINDBERG (University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, Vereinigte Staaten).²⁴⁸

Lagerpuffer: 100 g/L Glycerin.

Messpuffer: 100 mM HEPES, 2 g/L Triton X-100; 2 mM CaCl₂; 0,2 g/L NaN₃; 1 g/L BSA, pH 7,0.

Enzym-Stammlösung: 22,8 µM in Lagerpuffer.

Enzym-Messlösung: 9,6 nM in Messpuffer (verdünnt aus der Enzym-Stammlösung).

Substrat: Phac-Arg-Val-Arg-Arg-AMC;²⁴⁹ $K_M = 10,8 \mu\text{M}$.

Ein Messansatz für die Bestimmung der Hemmung bei einer Inhibitorkonzentration von 100 µM setzte sich wie folgt zusammen:

158 µL Messpuffer	
2 µL Inhibitor in DMSO	(10 mM; im Ansatz: 100 µM)
20 µL Substratlösung	(125 µM; im Ansatz: 12,5 µM)
20 µL Enzym-Messlösung	(Enzymkonzentration im Ansatz: 0,96 nM).

Für die Bestimmung von K_i - bzw. IC_{50} -Werten setzte sich ein Messansatz wie folgt zusammen:

158 µL Messpuffer	
2 µL Inhibitor in DMSO	(acht verschiedene Konzentrationen, abhängig vom Inhibitor)
20 µL Substratlösung	(125 µM; im Ansatz: 12,5 µM)
20 µL Enzym-Messlösung	(Enzymkonzentration im Ansatz: 0,96 nM).

Porcines Trypsin

Enzym: 8 E/mg; Merck KGaA; M = 23 kDa.

Lagerpuffer: 1 mM HCl.

Messpuffer: 50 mM Tris; 154 mM NaCl; 0,1 g/L Triton X-100; pH 8,0.²⁴⁴

Enzym-Stammlösung: 21,5 µM in Lagerpuffer.

Enzym-Messlösung: 530 pM in Messpuffer (verdünnt aus der Enzym-Stammlösung).

Substrat: Mes-D-Arg-Gly-Arg-AMC,²⁴⁷ $K_M = 5,8 \mu\text{M}$.

Ein Messansatz für die Bestimmung der Hemmung bei einer Inhibitorkonzentration von 100 µM setzte sich wie folgt zusammen:

100 µL Inhibitor in Messpuffer	(140 µM; im Ansatz: 100 µM)
20 µL Substratlösung	(140 µM; im Ansatz: 20 µM)
20 µL Enzym-Messlösung	(Enzymkonzentration im Ansatz: 76 pM).

Humane neutrophile Elastase

Enzym: #3244681, Calbiochem; M = 30 kDa.

Lagerpuffer: 50 mM NaOAc; 500 mM NaCl; pH 5,5.

Messpuffer: 50 mM Tris; 154 mM; pH 8,0.²⁴⁴

Enzym-Stammlösung: 1,69 μ M in Lagerpuffer

Enzym-Messlösung: 8,4 nM in Messpuffer (verdünnt aus der Enzym-Stammlösung).

Substrat: MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC;²⁵⁰ $K_M = 196 \mu$ M.

Ein Messansatz für die Bestimmung der Hemmung bei einer Inhibitorkonzentration von 100 μ M setzte sich wie folgt zusammen:

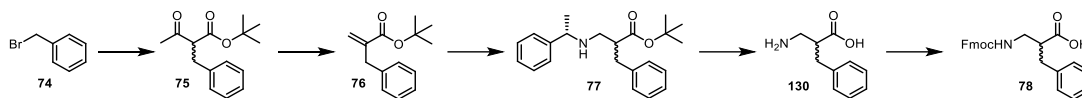
- 100 μ L Inhibitor in Messpuffer (140 μ M; im Ansatz: 100 μ M)
- 20 μ L Substratlösung (1,4 mM; im Ansatz: 200 μ M)
- 20 μ L Enzym-Messlösung (Enzymkonzentration im Ansatz: 1,20 nM).

Für die Bestimmung von K_i - bzw. IC_{50} -Werten setzte sich ein Messansatz wie folgt zusammen:

- 100 μ L Inhibitor in Messpuffer (acht verschiedene Konzentrationen, abhängig vom Inhibitor)
- 20 μ L Substratlösung (1,4 mM; im Ansatz: 200 μ M)
- 20 μ L Enzym-Messlösung (Enzymkonzentration im Ansatz: 1,20 nM).

5.3 Synthesevorschriften

5.3.1 Synthesen von Bausteinen für die Festphasenpeptidsynthese

Fmoc-DL-β²-Homophenylalanin (78)

tert-Butyl-2-benzyl-3-oxobutanoat (75). Eine Lösung von Kalium-*tert*-butanolat (1,2 Äq.; 34,5 mmol; 3,87 g), *tert*-Butanol (0,1 Äq.; 2,7 mmol; 273 µL) und *tert*-Butylacetoacetat (1,1 Äq.; 31,6 mmol; 5,00 g) in THF (150 mL) wurde unter Argon 30 min bei 0 °C gerührt. Dann wurde Benzylbromid (1,00 Äq.; 28,7 mmol; 3,41 mL) über einen Zeitraum von 5 min zugetropft. Anschließend wurde 6 h bei 65 °C gerührt. Nachdem das Gemisch wieder auf Umgebungstemperatur abgekühlt war, wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser (150 mL) abgebrochen. Dann wurden THF und Wasser *in vacuo* entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die so erhaltene Suspension wurde mit Wasser und gesättigter wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1), wonach der *tert*-Butylester **75** als farbloses Öl isoliert wurde (3,82 g; 15,4 mmol; 53 %). HPLC: 46,6 % B; MS (ESI⁺): ber. m/z 248,14; gef. m/z 271,04 [M+Na]⁺; ¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ 7,30 – 7,24 (m; 2H); 7,22 – 7,13 (m; 3H); 3,69 (dd; *J* = 7,8; 7,3; 1H); 3,11 (pt; *J* = 7,6; 2H); 2,19 (s; 3H); 1,38 (s; 9H).²⁵¹

tert-Butyl-2-benzylacrylat (76). Eine Lösung von LHMDS (1,1 Äq.; 16,8 mmol; 2,82 g) und dem *tert*-Butylester **75** (1,0 Äq.; 15,3 mmol; 3,80 g) in THF (150 mL) wurde unter Argon 30 min bei –78 °C gerührt. Dann wurde Paraformaldehyd im Überschuss (2,5 g) in einer Portion zugegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf Umgebungstemperatur erwärmt und dann 6 h bei dieser Temperatur gerührt. Dann wurde überschüssiges Paraformaldehyd abfiltriert und das Filtrat *in vacuo* eingeeengt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen. Die so erhaltene Suspension wurde mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung und gesättigter wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 20:1), wonach das *tert*-Butylacrylat **76** als farbloses Öl isoliert wurde (2,42 g; 11,1 mmol; 72 %). HPLC: 72,2 % B; MS (ESI⁺): ber. 218,13; gef. m/z 219,14 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ 7,32 – 7,26 (m; 2H); 7,23 – 7,17 (m; 3H); 6,15 (dt; *J* = 1,6; 0,8; 1H); 5,37 (q; *J* = 1,5; 1H); 3,60 (s; 2H); 1,43 (s; 9H).²⁵²

Fmoc-(*R,S*)-β²-homophenylalanin (78). Eine Lösung von (*S*)-1-phenylethan-1-amin (5,0 Äq.; 54,5 mmol; 6,60 g) und *tert*-Butyl-2-benzylacrylat (**76**; 1,0 Äq.; 10,9 mmol; 2,39 g) in Methanol (15 mL) wurde unter Argon bei 60 °C 120 h gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die so erhaltene Suspension wurde mit

wässriger KHSO_4 -Lösung (5 %) und gesättigter wässriger NaCl -Lösung gewaschen und *in vacuo* eingeeengt, wodurch das Rohprodukt **77** erhalten wurde (HPLC: 50,8 % B; MS (ESI⁺): ber. 339,22; gef. 340,16 [M+H]⁺). Dieses wurde in AcOH (90 % in Wasser; 100 mL) gelöst. Nach Zugabe von Palladium auf Aktivkohle (10 %; 239 mg) wurde das Gemisch unter Wasserstoff 18 h bei Umgebungstemperatur gerührt. Dann wurde der Katalysator abfiltriert und das Filtrat *in vacuo* eingeeengt. Der Rückstand wurde mit 32 % HBr in AcOH (10 mL) versetzt und 2 h bei Umgebungstemperatur gerührt. Dann wurde das Reaktionsgemisch in Diethylether (150 mL) getropft. Nach Zentrifugieren wurde das Rohprodukt **130** erhalten (MS (ESI⁺): ber. 179,09; gef. 180,07 [M+H]⁺). Dieses wurde in 1,4-Dioxan/Wasser 3:2 (50 mL) gelöst. Dazu wurden bei 0 °C unter Rühren DIPEA (3,5 mL; 20,0 mmol) und eine Lösung von Fmoc-OSu (3,37 g; 10,0 mmol) in 1,4-Dioxan (20 mL) gegeben. Nachdem die Mischung auf Umgebungstemperatur erwärmt worden war, wurde für 18 h bei dieser Temperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend *in vacuo* entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die so erhaltene Lösung wurde mit Wasser und gesättigter wässriger NaCl -Lösung gewaschen und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1 → 2:1; 1 % V/V AcOH), wonach das racemische Fmoc-β²-Homophenylalanin (**78**) als farbloser Feststoff isoliert wurde (2,14 g; 5,33 mmol; 49 %). HPLC: 63,8 % B; MS (ESI⁺): ber. 401,16, gef. m/z 402,14 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz; DMSO-*d*₆): δ 12,22 (s; 1H); 7,88 (d; *J* = 7,5; 2H); 7,69 (d; *J* = 7,5; 2H); 7,47 (t; *J* = 5,5; 1H); 7,41 (t; *J* = 7,3; 2H); 7,36 – 7,24 (m; 4H); 7,23 – 7,14 (m; 2H); 4,29 (m; 2H); 4,22 (m; 2H); 3,27 – 3,08 (m; 2H); 2,84 – 2,59 (m; 3H); ¹³C-NMR (101 MHz; DMSO-*d*₆): δ 174,6; 156,1; 143,9; 143,8; 140,7; 139,1; 128,7; 128,2; 127,6; 127,0; 126,1; 125,2; 120,1; 65,4; 47,0; 46,7; 42,0; 35,1.

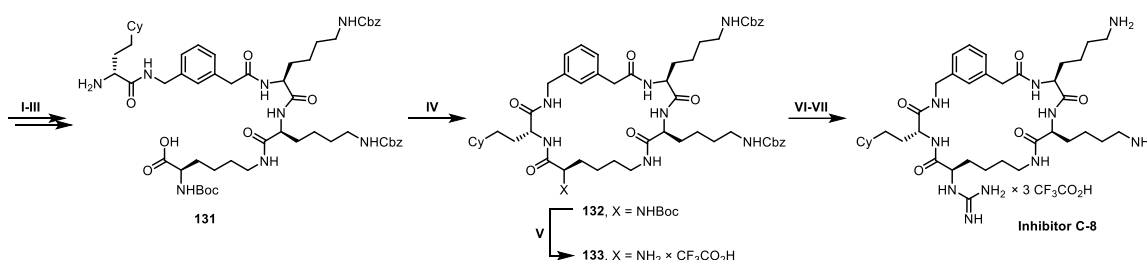
Fmoc-Nle(ε-OH)-OH (**88**)

Fmoc-Lys-OH (**87**; 1,00 g; 2,71 mmol; 1,0 Äq.; HPLC: 40,4 % B) und AcOH (286 µL; 13,6 mmol; 5,0 Äq.) wurden in THF/H₂O (5:1 V/V; 25 mL) gelöst. Unter Rühren wurde zu dieser Lösung bei Umgebungstemperatur über einen Zeitraum von 5 min eine Lösung von NaNO₂ (374 mg; 5,42 mmol; 2,0 Äq.) in H₂O (5,0 mL) getropft. Anschließend wurde 24 h bei Umgebungstemperatur gerührt. Dann wurde das THF *in vacuo* entfernt und die verbleibende wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert (3×). Die organischen Phasen wurden vereint, mit Wasser (2×) und gesättigter wässriger NaCl -Lösung gewaschen und dann *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit. Aus dem Rohprodukt wurde Fmoc-Nle(ε-OH)-OH (**88**) mittels präparativer HPLC (aufgeteilt auf drei Läufe) als farbloses Pulver isoliert (316 mg; 855 µmol; 32 % Ausbeute). HPLC: 48,6 % B; MS (ESI⁺): ber. 369,16; gef. 370,18 [M+H]⁺.²⁵³

5.3.2 Synthese der linkermodifizierten Inhibitoren C-1 bis C-49

Die Synthese jedes linkermodifizierten Inhibitors erfolgte analog zur Synthese der Leitstruktur **42**.¹²² Stellvertretend sei hier die Synthese des Inhibitors **C-8** im Detail beschrieben. Die übrigen Inhibitoren (**C-1** bis **C-7** und **C-9** bis **C-49**) wurden, abgesehen von der Verwendung unterschiedlicher Aminosäurebausteine in der Festphasenpeptidsynthese, auf gleiche Weise hergestellt. Die analytischen Daten der Inhibitoren **C-1** bis **C-49** sind in Tabelle 5.1 (S.167 f.) zusammengefasst; etwaige Besonderheiten bezüglich der Synthese sind dort ebenfalls ausgewiesen.

Synthese des Inhibitors C-8



I. Harzbeladung. Boc-D-Lys(Fmoc)-OH (188 mg; 0,40 mmol; 1,0 Äq.) und DIPEA (275 µL; 1,60 mmol; 4,0 Äq.) wurden in trockenem DCM (3,0 mL) gelöst. Diese Lösung wurde auf 2-CTC-Harz (250 mg; 0,40 mmol; 1,0 Äq.; Harzbeladung 1,60 mmol/g) gegeben. Nachdem diese Mischung 2 h geschüttelt worden war, wurde die Lösung abfiltriert. Das zurückbleibende Harz wurde mit DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1 V/V/V; 3,0 mL; 3×1 min) behandelt, anschließend mit DCM (2×), DMF (3×) und DCM (4×) gewaschen und dann *in vacuo* getrocknet.

II. Fmoc-Festphasenpeptidsynthese. Das nach I erhaltene, beladene Harz wurde mit DMF gewaschen (2×) und anschließend zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit einer Lösung von Piperidin in DMF (20 % V/V; 1×5 min und 1×15 min, je 3,0 mL) behandelt. Anschließend wurde das Harz mit DMF gewaschen (8×) und dann mit einer Lösung von Fmoc-Lys(Cbz)-OH (603 mg; 1,20 mmol; 3,0 Äq.), HATU (456 mg; 1,20 mmol; 3,0 Äq.) und DIPEA (414 µL; 2,40 mmol; 6,0 Äq.) in DMF (3,0 mL) versetzt und 1,5 h geschüttelt. Dann wurde das Lösungsmittel abfiltriert und das zurückbleibende Harz mit DMF gewaschen (2×). Die folgenden Fmoc-Aminosäuren (Fmoc-Lys(Cbz)-OH, Fmoc-3-Amphac-OH und Fmoc-D-hCha-OH) wurden unter Anwendung der gleichen Prozedur gekuppelt. Nach der letzten Kupplung wurde zweimal mit DMF gewaschen, zur Fmoc-Entfernung mit Piperidin in DMF (20 % V/V; 1×5 min und 1×15 min, je 3,0 mL) behandelt und dann mit DMF gewaschen (8×).

III. Mild-saure Abspaltung vom Harz. Das nach II erhaltene Harz wurde mit DCM gewaschen (3×) und dann 30 min mit einer Lösung von TFA in DCM (1 % V/V; 3,0 mL) behandelt. Dann wurde die Lösung abfiltriert und der pH-Wert des Filtrats mit DIPEA auf > 7 eingestellt. Das zurückbleibende Harz wurde noch drei weitere Male auf gleiche Weise mit 1 % TFA in DCM behandelt, wobei das nach Ablauf der 30 min erhaltene Filtrat immer sofort mit DIPEA auf pH > 7 eingestellt wurde. Im Anschluss

wurde das Harz mit DCM (3×) gewaschen. Die Waschphasen und die vier erhaltenen Filtrate wurden vereint und (sofern nötig) mit DIPEA erneut auf pH > 7 eingestellt. Die so erhaltene Lösung wurde bei vermindertem Druck eingeeengt, wonach das Boc/Cbz-geschützte Peptid **131** als Rohprodukt erhalten wurde (HPLC: 57,5 % B; MS (ESI⁺): ber. 1084,62; gef. 1085,79 [M+H]⁺).

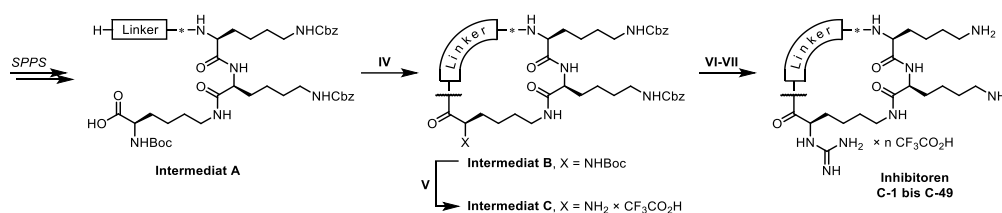
IV. Head-to-tail-Cyclisierung. Das nach III erhaltene Peptid **131** wurde in DMF (100 mL) gelöst. Unter Rühren wurden eine Lösung von HATU (456 mg; 1,20 mmol; 3,0 Äq.) in DMF (5,0 mL) und eine Lösung von DIPEA (414 µL; 2,40 mmol; 6,0 Äq.) in DMF (5,0 mL) jeweils über einen Zeitraum von 60 min zugegeben. Anschließend wurde weitere 60 min gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, wonach das Rohprodukt **132** als öliger Rückstand erhalten wurde.

V. Selektive Boc-Abspaltung in Gegenwart von Cbz-Schutzgruppen. Das nach IV erhaltene Rohprodukt (**132**) wurde mit HCl in 1,4-Dioxan (4 M; 5,0 mL) versetzt und 3 h gerührt. Im Laufe der Reaktion wurde eine Trübung der zu Beginn klaren Mischung beobachtet. Nach Ablauf der 3 h wurde das Reaktionsgemisch in Et₂O getropft. Ausgefallener Feststoff wurde abzentrifugiert und aus diesem Feststoff mittels präparativer HPLC das cyclische Peptid mit freier P1-Aminogruppe (**133**) isoliert (TFA-Salz; HPLC: 55,9 % B; MS (ESI⁺): ber. 966,56; gef. 967,58 [M+H]⁺).

VI. Überführung des Amins in ein zweifach Boc-geschütztes Guanidin. Das nach V erhaltene Peptid **133**, *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin²³⁵ (559 mg; 1,80 mmol; 4,5 Äq.) und DIPEA (517 µL; 3,00 mmol; 7,5 Äq.) wurden in DMF (5,0 mL) gelöst. Diese Lösung wurde 60 h gerührt und anschließend *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit.

VII. Simultane Boc- und Cbz-Abspaltung. Das nach VI erhaltene Rohprodukt wurde mit HBr in AcOH (32 % m/m; 3,0 mL) versetzt und 1,5 h gerührt (im Unterschied zur Umsetzung in Schritt V wurde hier keine Trübung beobachtet). Dann wurde das Reaktionsgemisch in Et₂O getropft. Ausgefallener Feststoff wurde abzentrifugiert. Nach präparativer HPLC wurde der Inhibitor **C-8** als farbloses Lyophilisat isoliert (TFA-Salz; 119 mg; 0,11 mmol; 27 % Ausbeute über alle Stufen). HPLC: 34,1 % B; MS (ESI⁺): ber. 740,51; gef. 741,39 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,63 (d; *J* = 6,4 Hz; 1H); 8,38 (t; *J* = 6,1 Hz; 1H); 8,20 (d; *J* = 8,3 Hz; 1H); 7,86 – 7,72 (m; 8H); 7,65 – 6,89^a (br; 8H); 7,48^b (t; *J* = 5,5 Hz); 7,21^b (t; *J* = 7,8 Hz); 7,16 – 7,11^b (m); 7,05^b (d; *J* = 7,6 Hz); 4,44 (dd; *J* = 15,5; 6,7 Hz; 1H); 4,32 – 4,24 (m; 1H); 4,19 – 4,06 (m; 3H); 3,97 – 3,89 (m; 1H); 3,05 – 2,91 (m; 1H); 2,83 – 2,68 (m; 5H); 1,90 – 0,77 (m; 33H); ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ 171,7; 171,53; 171,46; 170,8; 169,6; 158,5 (q; *J* = 32,2 Hz); 156,4; 139,2; 136,0; 128,2; 128,0; 127,5; 124,8; 116,9 (q; *J* = 298 Hz); 54,7; 53,5; 53,4; 52,1; 42,1; 41,7; 38,64; 38,60; 38,4; 36,6; 32,9; 32,8; 32,6; 31,6; 30,8; 30,5; 29,1; 27,9; 26,6; 26,5; 26,1; 25,8; 25,7; 22,6; 22,3; 21,6. ^{a,b}Das mit „a“ gekennzeichnete, breite Signal überlappt mit den mit „b“ gekennzeichneten Signalen, deren Verschiebungen, Multiplizitäten und Kopplungskonstanten jedoch bestimmbar blieben. Einzelne Integrale waren hingegen nicht bestimmbar; das Gesamtintegral ist beim breiten Signal angegeben.

Tabelle 5.1 Analytische Daten der linkermodifizierten Inhibitoren **C-1** bis **C-49** sowie zugehöriger Intermediate. Die Schritte I bis VII entsprechen denen der oben beschriebenen Synthese des Inhibitors **C-8**. Inh. **42** ist als Referenz mit aufgeführt.



Nr.	Linkerreste				Intermediat A		Int. B	Intermediat C		Finaler Inhibitor		
	P ω	P6	P5	P4	MS ^a	HPLC [%B]	HPLC [%B]	MS ^a	HPLC [%B]	MS ^a	HPLC ^b [%B]	Ausb. ^h
42	Gly	-	-	3-Amphac	975,44 (974,51)	49,6	57,4	857,47 (856,45)	46,7	631,44 (630,40)	17,0	24,4 (16 %)
C-1	γ -Abu	-	-	3-Aphac	989,61 (988,53)	49,6	56,3	871,36 (870,46)	46,8	645,29 (644,41)	19,3	6,0 (3,8) %
C-2	β -Ala	-	-	3-Aphac	975,59 (974,51)	49,6	58,5	857,80 (856,45)	46,3	631,38 (630,40)	17,6	4,4 (2,8 %)
C-3	Val	-	-	3-Amphac	1017,61 (1016,56)	51,6	63,7	899,54 (898,50)	50,5	673,44 (672,44)	22,0	31,5 (26 %)
C-4	D-Val	-	-	3-Amphac	n.b.	51,3	61,7	899,53 (898,50)	48,4	673,50 (672,44)	21,6	31,0 (20 %)
C-5	D-Pro	-	-	3-Amphac	1015,56 (1014,54)	51,2	59,7	897,47 (896,48)	48,3	671,51 (670,43)	20,5	36,1 (23 %)
C-6	D-Leu	-	-	3-Amphac	1031,61 (1030,57)	52,9	64,2	n.b.	50,0	687,42 (686,46)	24,9	13,9 (8,4 %)
C-7	D-Cha	-	-	3-Amphac	1071,77 (1070,61)	56,4	n.b.	953,46 (952,54)	53,0	727,60 (726,49)	30,1	46,7 (27 %)
C-8	D-hCha	-	-	3-Amphac	1085,79 (1084,62)	57,5	n.b.	967,58 (966,56)	55,9	741,39 (740,51)	34,1	47,6 (27 %)
C-9	D-Phe	-	-	3-Amphac	1065,66 (1064,56)	54,3	65,0	947,38 (946,50)	50,9	721,30 (720,44)	25,9	7,6 (4,5 %)
C-10	D-hPhe	-	-	3-Amphac	1079,69 (1078,57)	54,9	n.b.	961,49 (960,51)	52,9	735,32 (734,46)	29,3	7,3 (4,2 %)
C-11	Gly	-	-	ϵ -Aca	941,47 (940,53)	48,3	55,9	823,46 (822,46)	44,9	597,36 (596,41)	14,5	24,5 (16 %)
C-12	Gly	-	-	δ -Ava	927,42 (926,51)	47,8	54,9	809,33 (808,45)	44,2	583,41 (582,40)	13,2	23,2 (16 %)
C-13	Gly	-	-	γ -Abu	913,43 (912,50)	47,7	54,0	795,35 (794,43)	43,7	569,33 (568,38)	12,5	24,3 (17 %)
C-14	Gly	-	Gly	β -Ala	956,49 (955,50)	47,1	52,0	838,37 (837,44)	42,8	612,42 (611,39)	11,9	27,4 (18 %)
C-15	Gly	-	β -Ala	Gly	956,52 (955,50)	47,2	52,9	838,44 (837,44)	43,0	612,70 (611,39)	12,6	22,4 (15 %)
C-16	Gly	-	Gly	Gly	942,45 (941,49)	47,0	52,3	824,63 (823,42)	42,2	598,40 (597,37)	12,0 (91,8)	19,8 (13 %)
C-17	β -Ala	-	Gly	Gly	956,49 (955,50)	47,1	52,6	838,58 (837,44)	42,5	612,45 (611,39)	11,8	9,4 (6 %)
C-18	Gly	-	Gly	Ala	956,50 (955,50)	46,0	53,0	838,43 (837,44)	42,8	612,41 (611,39)	13,4	16,5 (11 %)
C-19	Gly	-	Gly	D-Ala	956,43 (955,50)	n.b.	53,3	838,42 (837,44)	42,7	612,19 (611,39)	13,3	18,6 (12 %)
C-20	Gly	-	Gly	Phe	1032,60 (1031,53)	49,8	59,0	914,28 (913,47)	47,8	344,84 ^b (687,42)	21,8 (88,3)	17,9 (11 %)
C-21	Gly	-	Gly	D-Phe	1032,53 (1031,53)	51,5	59,3	914,37 (913,47)	47,8	688,18 (687,42)	20,1	14,0 (8,5 %)
C-22	Gly	-	Phe	Gly	1032,63 (1031,53)	51,1	59,3	914,46 (913,47)	47,6	344,82 ^b (687,42)	20,7	38,1 (23 %)
C-23	Gly	-	D-Phe	Gly	1032,67 (1031,53)	51,0	59,8	914,39 (913,47)	47,6	344,82 ^b (687,42)	20,9	35,2 (21 %)
C-24	Gly	Gly	Gly	Phe	1089,73 (1088,55)	50,6	57,6	971,64 (970,49)	47,9	745,53 (744,44)	20,9	24,5 (14 %)
C-25	Gly	Gly	Gly	D-Phe	1089,73 (1088,55)	51,8	58,6	971,86 (970,49)	48,2	745,67 (744,44)	19,4	29,6 (17 %)
C-26	Gly	Gly	Phe	Gly	1089,69 (1088,55)	51,0	58,7	971,20 (970,49)	48,1	745,48 (744,44)	20,7	26,8 (15 %)
C-27	Gly	Gly	D-Phe	Gly	1089,49 (1088,55)	51,0	58,6	971,50 (970,49)	48,1	745,09 (744,44)	20,3	31,3 (18 %)

Tabelle 5.1 (Fortsetzung)

Nr.	P ω	P6	P5	P4	Intermediat A		Int. B	Intermediat C		Finaler Inhibitor		
					MS ^a	HPLC [%B]	HPLC [%B]	MS ^a	HPLC [%B]	MS ^a	HPLC ^b [%B]	Ausb. ^h
C-28	Gly	Phe	Gly	Gly	1089,61 (1088,55)	50,1	58,8	971,53 (970,49)	46,9	745,20 (744,44)	20,6	26,8 (15 %)
C-29	Gly	D-Phe	Gly	Gly	1089,67 (1088,55)	49,9	58,1	971,31 (970,49)	47,4	745,32 (744,44)	20,7	12,3 (7,1 %)
C-30 ^f	Gly	Gly	Gly	Arg ^c	1156,60 (1155,62)	51,6	58,0	938,56 (937,50)	40,2	377,83 ^b (753,47)	12,8	27,0 (14 %)
C-31 ^f	Gly	Gly	Gly	D-Arg ^d	1156,57 (1155,62)	52,4	58,7	938,50 (937,50)	39,7	754,30 (753,47)	12,6	26,5 (14 %)
C-32	Gly	-	β -Ala	Ala	970,41 (969,52)	46,9	53,3	852,34 (851,45)	43,2	626,39 (625,40)	12,7	12,3 (7,9 %)
C-33	Gly	-	β -Ala	Val	998,62 (997,55)	48,3	56,5	880,49 (879,49)	45,3	654,68 (653,43)	16,6	27,4 (17 %)
C-34	Gly	-	β -Ala	Leu	1012,73 (1011,56)	50,1	59,0	894,52 (893,50)	47,4	668,10 (667,45)	19,6	17,0 (11 %)
C-35	Gly	-	β -Ala	D-Ala	970,63 (969,52)	47,8	55,2	852,67 (851,45)	43,8	626,10 (625,40)	13,4 (94,5)	23,7 (15 %)
C-36	Gly	-	β -Ala	D-Val	998,65 (997,55)	50,0	58,7	880,50 (879,49)	46,6	654,20 (653,43)	15,7	20,1 (13 %)
C-37	Gly	-	β -Ala	D-Leu	1012,77 (1011,56)	51,8	61,0	894,56 (893,50)	48,8	668,10 (667,45)	18,7 (92,1)	4,8 (2,9 %)
C-38	Gly	-	β -Ala	D-Nle	1015,56 (1011,56)	51,8	61,1	894,70 (893,50)	48,5	668,48 (667,45)	19,1	17,2 (11 %)
C-39	Gly	-	β -Ala	D-Cha	1052,79 (1051,60)	56,1	65,2	934,78 (933,53)	53,6	708,61 (707,48)	24,2	29,3 (17 %)
C-40	Gly	-	β -Ala	D-Pro	996,50 (995,53)	48,6	56,9	878,43 (877,47)	44,6	652,57 (651,42)	15,1 (93,2)	36,1 (23 %)
C-41	Gly	-	β -Ala	D-Phg	1032,53 (1031,53)	52,0	60,0	914,34 (913,47)	48,7	688,59 (687,42)	17,3	20,4 (12 %)
C-42	Gly	-	β -Ala	D-Phe	1046,43 (1045,55)	52,3	61,4	928,41 (927,49)	48,9	702,45 (701,43)	20,1	10,5 (6,3 %)
C-43	Gly	-	β -Ala	D-hPhe	1060,64 (1059,56)	53,7	63,0	942,49 (941,50)	50,7	716,37 (715,45)	23,1	22,3 (13 %)
C-44 ^g	Gly	-	Gly	D- β^2 -hPhe ^e	1046,57 (1045,55)	49,4	59,4 59,7	928,43 (927,49)	47,9	702,67 (701,43)	19,4	14,3 (8,5 %)
C-45 ^g	Gly	-	Gly	L- β^2 -hPhe ^e	1046,57 (1045,55)	49,4	59,4 59,7	928,49 (927,49)	47,4	702,60 (701,43)	20,2	22,8 (14 %)
C-46	ϵ -Aca	-	-	-	884,51 (883,51)	48,7	59,1	766,36 (765,44)	45,3	540,02 (539,39)	11,9	34,8 (25 %)
C-47	δ -Ava	-	-	-	870,42 (869,49)	48,4	56,8	752,37 (751,43)	44,3	526,31 (525,38)	12,4 (92,4)	51,8 (37 %)
C-48	γ -Abu	-	-	-	856,40 (855,47)	48,4	55,9	738,39 (737,41)	44,2	512,31 (511,36)	11,9	33,0 (24 %)
C-49	β -Ala	-	-	-	842,31 (841,46)	48,3	55,7	724,38 (723,40)	43,8	498,32 (497,34)	11,9 (92,0)	38,8 (29 %)

^a(ESI⁺), wenn nicht anders vermerkt, ist m/z des gef. [M+H]⁺-Signals angegeben; die ber. monoisotopische Masse ist in Klammern angegeben.

^bGef. m/z des [M+2H]²⁺-Signals.

^{c-e}Präkursoren/Schutzgruppen:

^cStufe A,B: Orn(Boc); Stufe C: Orn

^dStufe A,B: D-Orn(Boc); Stufe C: D-Orn

^eStufe A,B: DL- β^2 -hPhe

^fSchritt VI: 9,0 Äq. N,N'-Di-Boc-1H-pyrazol-1-carboxamidin, 15 Äq. DIPEA.

^gIntermediat A: H-Lys(Cbz)-Lys(Cbz)-s(Boc)-D-Lys-Gly-DL- β^2 -hPhe-OH; Intermediat C: Zwei in der HPLC unterscheidbare Diastereomere.

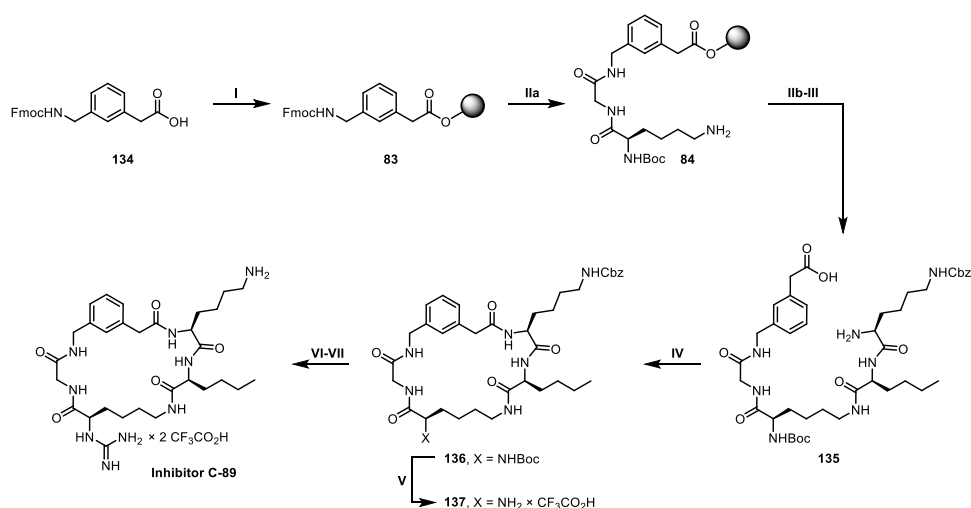
^hReinheit immer > 95 %, wenn nicht anders angegeben. Falls die Reinheit < 95 % ist, ist die Reinheit in Klammern angegeben.

^hAusbeute in [mg], in Klammern darunter die Ausbeute in Prozent über alle Stufen bezogen auf das unbeladene Startharz.

5.3.3 Synthese der P3- bzw. P2-modifizierten Inhibitoren C-50 bis C-90

Die Synthese der Inhibitoren **C-50** bis **C-90** erfolgte ausgehend vom harzgebundenen Präkursorpeptid **84**. An dieses harzgebundene Intermediat wurden anschließend nach einem Standard-Fmoc-Protokoll die jeweiligen P2- und P3-Reste gekuppelt. Die auf die Festphasenpeptidsynthese folgenden Schritte sind die gleichen, die auch zur Synthese der linkermodifizierten Derivate benutzt wurden. Hier sei nun stellvertretend die Synthese des Inhibitors **C-89** im Detail erläutert. Die übrigen Inhibitoren **C-50** bis **C-88** und **C-90** wurden auf gleiche Weise hergestellt, abgesehen natürlich von der Verwendung unterschiedlicher Aminosäurebausteine in der Festphasenpeptidsynthese. Des Weiteren wurden in einigen Fällen zusätzliche Schritte durchgeführt, um Präkursoren in die gewünschten Aminosäurereste zu überführen bzw. um Seitenkettenschutzgruppen von Aminosäureresten abzuspalten. Die analytischen Daten der Inhibitoren **C-50** bis **C-90** sind in Tabelle 5.2 (S.172) zusammengefasst; etwaige Besonderheiten bezüglich der Synthese oder zusätzliche Schritte sind dort ebenfalls erläutert.

Synthese des Inhibitors C-89



I. Harzbeladung. Fmoc-3-Amphac-OH (**134**; 2,00 g; 3,20 mmol; 1,0 Äq.) und DIPEA (2,2 mL; 12,8 mmol; 4,0 Äq.) wurden in trockenem DCM (15 mL) gelöst. Diese Lösung wurde auf 2-CTC-Harz (1,00 g; 3,20 mmol; 1,0 Äq.; Harzbeladung 1,60 mmol/g) gegeben. Nachdem diese Mischung 2 h geschüttelt worden war, wurde die Lösung abfiltriert. Das zurückbleibende Harz wurde mit DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1 V/V/V; 15 mL; 3×1 min) behandelt, anschließend mit DCM (2×), DMF (3×) und DCM (4×) gewaschen und dann *in vacuo* getrocknet, wonach 2,93 g ($b = 0,84$ mmol/g; 2,46 mmol) des beladenen Harzes **83** isoliert wurden.

IIa. Kupplung des P0- und des P1-Bausteins. Das nach I erhaltene Harz wurde mit DMF gewaschen (2×) und anschließend zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit einer Lösung von Piperidin in DMF (20 % V/V; 1×5 min und 1×15 min, je 3,0 mL) behandelt. Anschließend wurde das Harz mit DMF

gewaschen (8×) und dann mit einer Lösung von Fmoc-Gly-OH (2,20 g; 7,38 mmol; 3,0 Äq.), HATU (2,80 g; 7,38 mmol; 3,0 Äq.) und DIPEA (2,6 mL; 14,8 mmol; 6,0 Äq.) in DMF (15 mL) versetzt und 1,5 h geschüttelt. Dann wurde das Lösungsmittel abfiltriert und das zurückbleibende Harz mit DMF gewaschen (2×). Die folgende Fmoc-Aminosäure (Boc-D-Lys(Fmoc)-OH) wurde unter Anwendung der gleichen Prozedur gekuppelt. Anschließend wurde zusätzlich noch zweimal mit DMF gewaschen und dann zur Entfernung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe mit einer Lösung von Piperidin in DMF (20 % V/V; 1×5 min und 1×15 min, je 3,0 mL) behandelt. Danach wurde das Harz mit DMF (8×) und DCM (3×) gewaschen. Nach Trocknung *in vacuo* wurden 2,94 g ($b = 0,74$ mmol/g) des Präkursor-Harzes **84** erhalten.

IIb. Kupplung des P2- und des P3-Bausteins. Ein Teil des nach IIa erhaltenen Harzes (450 mg; $b = 0,74$ mmol/g; 0,33 mmol) wurde (unter den gleichen Bedingungen wie in Schritt IIa für Fmoc-Gly-OH beschrieben) mit Fmoc-Nle-OH und dann mit Fmoc-Lys(Cbz)-OH gekuppelt. Anschließend wurde zusätzlich noch zweimal mit DMF gewaschen und dann zur Entfernung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe mit einer Lösung von Piperidin in DMF (20 % V/V; 1×5 min und 1×15 min, je 3,0 mL) behandelt. Danach wurde das Harz mit DMF gewaschen (8×).

III. Mild-saure Abspaltung vom Harz. Das nach IIb erhaltene Harz wurde mit DCM gewaschen (3×) und dann 30 min mit einer Lösung von TFA in DCM (1 % V/V; 3,0 mL) behandelt. Dann wurde die Lösung abfiltriert und der pH-Wert des Filtrats mit DIPEA auf > 7 eingestellt. Das zurückbleibende Harz wurde noch drei weitere Male auf gleiche Weise mit 1 % TFA in DCM behandelt, wobei das nach Ablauf der 30 min erhaltene Filtrat immer sofort mit DIPEA auf $\text{pH} > 7$ eingestellt wurde. Im Anschluss wurde das Harz mit DCM (3×) gewaschen. Diese Waschphasen und die vier erhaltenen Filtrate wurden vereint und (sofern nötig) mit DIPEA erneut auf $\text{pH} > 7$ eingestellt. Die so erhaltene Lösung wurde bei vermindertem Druck eingeeengt, wonach das Boc/Cbz-geschützte Peptid **135** als Rohprodukt erhalten wurde (HPLC: 42,1 % B; MS (ESI⁺): ber. 825,46; gef. 826,51 [M+H]⁺).

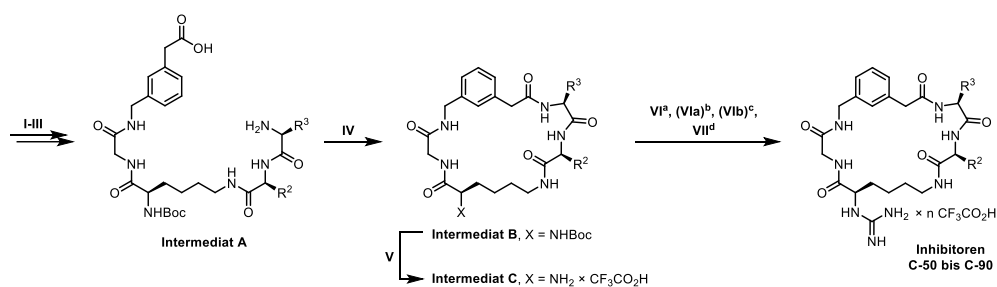
IV. Head-to-tail-Cyclisierung. Das nach III erhaltene Peptid **135** wurde in DMF (100 mL) gelöst. Unter Rühren wurden eine Lösung von HATU (380 mg; 1,00 mmol; 3,0 Äq.) in DMF (5,0 mL) und eine Lösung von DIPEA (349 μL ; 2,00 mmol; 6,0 Äq.) in DMF (5,0 mL) jeweils über einen Zeitraum von 60 min zugegeben, woran anschließend weitere 60 min gerührt wurde. Dann wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, wonach das Rohprodukt **136** als öliger Rückstand erhalten wurde (HPLC: 54,2 % B).

V. Selektive Boc-Abspaltung in Gegenwart einer Cbz-Schutzgruppe. Das nach IV erhaltene Rohprodukt **136** wurde mit HCl in 1,4-Dioxan (4 M; 5,0 mL) versetzt und 3 h gerührt. Im Laufe der Reaktion wurde eine Trübung der zu Beginn klaren Mischung beobachtet. Nach Ablauf der 3 h wurde das Reaktionsgemisch in Et₂O getropft. Ausgefällener Feststoff wurde abzentrifugiert und aus diesem Feststoff mittels präparativer HPLC das cyclische Peptid mit freier P1-Aminogruppe (**137**) isoliert (TFA-Salz; 141 mg; 172 μmol ; HPLC: 42,4 % B; MS (ESI⁺): ber. 707,40; gef. 708,40 [M+H]⁺).

VI. Überführung des Amins in ein zweifach Boc-geschütztes Guanidin. Das nach V erhaltene Peptid **137** (141 mg; 172 μmol ; 1,0 Äq.), *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin²³⁵ (240 mg; 774 μmol ; 4,5 Äq.) und DIPEA (225 μL ; 1,29 mmol; 7,5 Äq.) wurden in DMF (5,0 mL) gelöst. Diese Lösung wurde 60 h gerührt und anschließend *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

VII. Simultane Boc- und Cbz-Abspaltung. Das nach VI erhaltene Rohprodukt wurde mit HBr in AcOH (32 % m/m; 3,0 mL) versetzt und 1,5 h gerührt (im Unterschied zur Umsetzung unter V wurde hier keine Trübung beobachtet). Nach Ablauf der 1,5 h wurde das Reaktionsgemisch in Et₂O getropft. Ausgefallener Feststoff wurde abzentrifugiert und aus diesem Feststoff mittels präparativer HPLC und anschließender Lyophilisierung der Inhibitor **C-89** als farbloses Pulver isoliert (TFA-Salz; 78,2 mg; 92,7 μmol ; 19 % Ausbeute über alle Stufen). HPLC: 25,6 % B; MS (ESI⁺): ber. 615,39; gef. 616,42 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,50 (d; *J* = 6,6 Hz; 1H); 8,37 (dd; *J* = 6,9; 4,9 Hz; 1H); 8,15 (t; *J* = 6,0 Hz; 1H); 7,84 – 7,65 (m; 5H); 7,55 (t; *J* = 5,6 Hz; 1H); 7,50 – 7,03^a (br; 7H); 7,22^b (t; *J* = 7,6 Hz); 7,19^b (d; *J* = 1,7 Hz); 7,10^b (ddt; *J* = 17,9; 7,6; 1,5 Hz); 4,42 – 4,26 (m; 2H); 4,22 – 3,92 (m; 4H); 3,69 – 3,41 (m; 4H); 3,05 – 2,95 (m; 1H); 2,93 – 2,83 (m; 1H); 2,83 – 2,69 (m; 2H); 1,80 – 1,10 (m; 18H); 0,83 (t; *J* = 7,0 Hz; 3H); ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ 171,5; 171,2; 171,1; 170,2; 168,6; 158,4 (q; *J* = 31,5 Hz); 156,5; 139,0; 136,0; 128,1; 128,0; 127,7; 125,1; 117,2^c (q; *J* = 299 Hz); 54,2; 53,7; 52,4; 42,7; 42,1; 41,8; 38,6; 38,1; 31,6; 31,1; 30,6; 28,0; 27,4; 26,6; 22,4; 21,7; 21,4; 13,8. ^{a,b}Das mit „a“ gekennzeichnete, breite Signal überlappt mit den mit „b“ gekennzeichneten Signalen, deren Verschiebungen, Multiplizitäten und Kopplungskonstanten jedoch bestimmbar blieben. Einzelne Integrale waren hingegen nicht bestimmbar; das Gesamtintegral ist beim breiten Signal angegeben. ^cDie beiden äußeren Signale des Quartetts gehen im Rauschen unter.

Tabelle 5.2 Analytische Daten der P3- bzw. P2-modifizierten Inhibitoren **C-50** bis **C-90** sowie zugehöriger Intermediate. Die Schritte I bis VII entsprechen denen der oben beschriebenen Synthese von **C-89**. Inh. **42** ist als Referenz mit aufgeführt.



Nr.	P3	P2	Intermediat A		Int. B	Intermediat C		Finaler Inhibitor		
			MS ^e	HPLC [%B]	HPLC [%B]	MS ^e	HPLC [%B]	MS ^e	HPLC ^u [%B]	Ausb. ^v
42	Lys ^g	Lys ^g	975,44 (974,51)	49,6	57,4	857,47 (856,45)	46,7	631,44 (630,40)	17,0	24,4 (16 %)
C-50	nArg ^h	Lys ^g	913,47 (912,50)	47,2	54,7	695,33 (694,38)	30,8	645,38 (644,39)	16,7	49,6 (31 %)
C-51	Arg ⁱ	Lys ^g	927,46 (926,51)	47,3	55,4	n.b.	30,9	659,60 (658,40)	18,0	14,6 (9,1 %)
C-52	Phe(3-CH ₂ NH ₂) ^j	Lys ^g	885,55 (884,44)	45,2	54,6	767,34 (766,38)	42,7	679,42 (678,40)	19,8	6,5 (4,0 %)
C-53	Phe(4-CH ₂ NH ₂) ^k	Lys ^g	885,43 (884,44)	45,2	54,4	767,28 (766,38)	42,5	340,33 ^f (678,40)	19,4 (88,3)	2,0 (1,2 %)
C-54	Gln ^l	Lys ^g	1083,49 (1082,55)	56,3	66,4	965,54 (964,48)	54,4	631,40 (630,36)	17,3	5,9 (4,3 %)
C-55	Cit	Lys ^g	870,38 (869,46)	41,1	44,6	752,39 (751,40)	33,3	660,40 (659,39)	18,2 (90,7)	13,8 (9,7 %)
C-56	Nle(ε-OH) ^e	Lys ^m	1005,47 (1004,56)	46,8	55,0	887,44 (886,50)	43,4	316,82 ^f (631,38)	19,2	3,4 (2,4 %)
C-57 ²⁰⁷	Tyr ⁿ	Lys ^g	932,64 (931,51)	50,5	60,6	758,32 (757,38)	38,4	666,34 (665,36)	22,8	10,0 (7,0 %)
C-58	Tyr(3-NH ₂) ^o	Lys ^g	921,42 (920,43)	46,4	54,7	803,53 (802,36)	42,8	681,33 (680,38)	18,1	13,7 (9,4 %)
C-59	Tyr(3-NH ₂ , O-C(NH)NH ₂) ^o	Lys ^g	921,42 (920,43)	46,4	54,7	803,53 (802,36)	42,8	723,70 (722,40)	23,1 (87,0)	3,3 (2,0 %)
C-60	Phe(3-CN)	Lys ^g	885,55 (884,44)	45,2	54,6	767,34 (766,38)	42,7	675,34 (674,37)	27,8	19,7 (14 %)
C-61	Phe(3-C(O)NH ₂) ^j	Lys ^g	885,55 (884,44)	45,2	54,6	767,34 (766,38)	42,7	693,39 (692,38)	22,8	2,1 (1,4 %)
C-62	Trp ^p	Lys ^g	999,47 (998,51)	54,8	56,1	781,97 (780,40)	43,8	689,25 (688,38)	28,5	4,3 (2,9 %)
C-63	Phe	Lys ^g	860,50 (859,45)	45,1	55,6	742,80 (741,38)	43,1	650,21 (649,37)	27,5 (92,4)	5,2 (3,7 %)
C-64 ²⁰⁷	hPhe	Lys ^g	874,51 (873,46)	48,3	57,5	756,32 (755,40)	45,1	664,35 (663,39)	29,8	7,6 (5,3 %)
C-65	2-Nal	Lys ^g	910,50 (909,46)	48,4	60,1	792,63 (791,40)	47,7	700,36 (699,39)	33,2	10,8 (7,3 %)
C-66 ²⁰⁷	1-Nal	Lys ^g	910,39 (909,46)	50,7	n.b.	792,42 (791,40)	48,8	700,38 (699,39)	33,1	12,9 (8,7 %)
C-67	Cha	Lys ^g	866,55 (865,49)	47,5	n.b.	n.b.	47,0	656,56 (655,45)	31,8	32,8 (23 %)
C-68	Nle	Lys ^g	826,51 (825,46)	42,1	54,2	708,40 (707,40)	42,4	616,42 (615,39)	25,6	21,6 (16 %)
C-69	Ala	Lys ^g	784,38 (783,42)	41,7	n.b.	666,55 (665,35)	35,5	574,54 (573,34)	18,5	1,8 (1,4 %)
C-70	Dab ^q	Lys ^g	946,48 (947,48)	49,3	57,1	829,40 (828,42)	45,6	603,11 (602,37)	16,4	6,7 (7,1 %)
C-71 ^s	Lys ^g	nArg ^h	913,44 (912,50)	46,3	54,5	695,34 (694,38)	32,0	323,29 ^f (644,39)	17,1	40,7 (26 %)
C-72	Lys ^g	Arg ⁱ	927,48 (926,51)	47,1	55,3	n.b.	32,0	659,41 (658,40)	17,7	15,1 (9,4 %)
C-73	Lys ^g	Phe(3-CH ₂ NH ₂) ^j	885,57 (884,44)	45,5	54,0	767,34 (766,38)	42,6	679,70 (678,40)	19,0	3,9 (2,4 %)
C-74	Lys ^g	Phe(4-CH ₂ NH ₂) ^k	885,51 (884,44)	45,6	53,6	767,43 (766,38)	42,4	678,40 (678,40)	19,0 (92,8)	2,8 (1,7 %)
C-75	Lys ^g	Gln ^l	1083,53 (1082,55)	55,9	65,7	n.b.	54,1	631,31 (630,36)	17,5	27,3 (20 %)

Tabelle 5.2 (Fortsetzung)

Nr.	P3	P2	Intermediat A		Int. B	Intermediat C		Finaler Inhibitor		
			MS ^e	HPLC [%B]	HPLC [%B]	MS ^e	HPLC [%B]	MS ^e	HPLC ^u [%B]	Ausb. ^v
C-76	Lys [§]	Cit	870,40 (869,46)	40,5	44,8	752,33 (751,40)	34,0	660,30 (659,39)	17,6 (92,4)	5,3 (3,7 %)
C-77	Lys ^m	Nle(ε-OH) [§]	1005,50 (1004,56)	47,0	54,7	887,42 (886,50)	43,2	316,84 ^f (631,38)	19,2 (60,0)	1,1 (0,8 %)
C-78 ²⁰⁷	Lys [§]	Tyr ⁿ	932,53 (931,51)	50,6	60,6	758,37 (757,38)	38,4	666,40 (665,36)	22,2	5,2 (3,7 %)
C-79	Lys [§]	Tyr(3-NH ₂) ^o	921,31 (920,43)	46,7	54,2	803,22 (802,36)	42,8	681,29 (680,38)	19,0	3,0 (2,1 %)
C-80	Lys [§]	Tyr(3-NH ₂ ,O-C(NH)NH ₂) ^o	921,31 (920,43)	46,7	54,2	803,22 (802,36)	42,8	723,33 (722,40)	22,9	2,0 (1,2 %)
C-81	Lys [§]	Phe(3-CN)	885,57 (884,44)	45,5	54,0	767,34 (766,38)	42,6	675,38 (674,37)	26,1	24,5 (17 %)
C-82	Lys [§]	Phe(3-C(O)NH ₂) ^j	885,57 (884,44)	45,5	54,0	767,34 (766,38)	42,6	693,10 (692,38)	21,8	2,1 (1,4 %)
C-83	Lys [§]	Trp ^r	999,43 (998,51)	53,8	64,7	781,37 (780,40)	42,4	689,28 (688,38)	26,2	18,6 (13 %)
C-84	Lys [§]	Phe	860,42 (859,45)	45,7	54,7	742,32 (741,38)	42,8	650,37 (649,37)	25,5	5,3 (3,8 %)
C-85	Lys [§]	hPhe	874,51 (873,46)	47,4	n.b.	756,42 (755,40)	44,6	332,87 ^f (663,39)	28,8 (89,3)	21,2 (15 %)
C-86	Lys [§]	2-Nal	910,48 (909,46)	49,0	58,8	792,41 (791,40)	46,6	700,46 (699,39)	30,5	19,3 (13 %)
C-87	Lys [§]	1-Nal	910,43 (909,46)	48,6	59,1	792,45 (791,40)	46,5	700,10 (699,39)	30,7	3,1 (2,1 %)
C-88	Lys [§]	Cha	866,44 (865,49)	48,6	n.b.	n.b.	46,2	656,61 (655,42)	30,5	27,1 (19 %)
C-89	Lys [§]	Nle	826,40 (825,46)	45,3	54,3	708,37 (707,40)	42,1	616,37 (615,39)	25,4	20,3 (15 %)
C-90 ^t	Lys [§]	Ala	784,22 (783,42)	41,5	47,6	666,42 (665,35)	35,7	574,30 (573,34)	18,1	30,1 (23 %)

^aUmsetzung VI bei den Synthesen v. **C-50**, **C-51**, **C-71**, **C-72**: 9,0 Äq. *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin, 15 Äq. DIPEA; sonst immer analog zur Synthese v. **C-89**.

^bUmsetzung VIa (nur bei den Synthesen v. **C-52**, **C-53**, **C-58**, **C-59**, **C-73**, **C-74**, **C-79**, **C-80**): Das nach Umsetzung VI erhaltene Rohprodukt wurde in 25 mL AcOH/H₂O 9:1 (V/V) gelöst. Pd/C (10 %; ca. 100 mg Pd/C pro 1 mmol zu hydrierenden Edukts) wurde zugegeben und die Mischung bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle mittels MS) unter einer H₂-Atmosphäre gerührt (3 h bis 18 h).

^cUmsetzung VIb (nur bei den Synthesen v. **C-56**, **C-77**): Das nach Umsetzung VI erhaltene Rohprodukt wurde analog zur Herstellung von **88** (S.164) umgesetzt. Anschließend wurde das so erhaltene Rohprodukt mit TFA zur Entfernung der Boc-Schutzgruppen mit TFA (3,0 mL) behandelt. Nach Reinigung mittels präparativer HPLC wurde die Dde-Schutzgruppe unter milden Bedingungen nach BRADLEY²³⁸ mit NH₂OH×HCl/Imidazol in NMP/DCM entfernt. Final wurde nochmals mittels präparativer HPLC gereinigt.

^dUmsetzung VII bei den Synthesen v. **C-56**, **C-77** nicht durchgeführt.

^e(ESI⁺), wenn nicht anders vermerkt, ist m/z des gef. [M+H]⁺-Signals angegeben; die ber. monoisotopische Masse ist in Klammern angegeben.

^fGef. m/z des [M+2H]²⁺-Signals.

[§]Präkursoren/Schutzgruppen:

[§]Intermediat A,B,C: Lys(Cbz)

^hIntermediat A,B: Dab(Boc); Intermediat C: Dab × CF₃CO₂H

ⁱIntermediat A,B: Orn(Boc); Intermediat C: Orn × CF₃CO₂H

^jIntermediat A,B,C: Phe(3-CN)

^kIntermediat A,B,C: Phe(4-CN)

^lIntermediat A,B,C: Gln(Trt)

^mIntermediat A,B,C: Lys(Dde)

ⁿIntermediat A,B: Tyr(*t*Bu)

^oIntermediat A,B,C: Tyr(3-NO₂)

^pIntermediat A: Trp(Boc)

^qIntermediat A,B,C: Dab(Cbz)

^rIntermediat A,B: Trp(Boc)

^sNMR v. **C-71**: ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,61 (d; *J* = 5,9 Hz; 1H); 8,40 (dd; *J* = 6,9; 4,9 Hz; 1H); 8,18 (t; *J* = 6,0 Hz; 1H); 7,98 (d; *J* = 8,0 Hz; 1H); 7,86 – 7,72 (m; 4H); 7,68 (t; *J* = 5,7 Hz; 1H); 7,50 – 6,97^a (br; 13H); 7,45^b (t; *J* = 5,6 Hz); 7,22^b (t; *J* = 7,6 Hz); 7,18^b (t; *J* = 1,7 Hz); 7,10^b (ddt; *J* = 13,2; 7,6; 1,4 Hz); 4,40 – 4,25 (m; 2H); 4,22 – 4,10 (m; 2H); 4,04 (dd; *J* = 15,9; 6,9 Hz; 1H); 3,93 (dt; *J* = 8,8; 5,6 Hz; 1H); 3,68 – 3,40 (m; 4H); 3,13 – 3,02 (m; 1H); 3,02 – 2,84 (m; 2H); 2,82 – 2,72 (m; 2H); 2,06 – 1,92 (m; 1H); 1,78 – 1,11 (m; 13H); ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*D*₆): δ 172,0; 171,7; 170,5; 170,2; 168,7; 158,6 (q;

$J = 31,4$ Hz); 156,9; 156,5; 139,0; 136,0; 128,1; 128,0; 127,5; 125,2; 117,1 (q; $J = 299$ Hz); 54,7; 53,7; 50,2; 42,7; 42,0; 41,9; 38,6; 38,3; 38,0; 31,6; 30,7; 30,3; 27,9; 26,6; 22,5; 21,4; a,b: s. unter Schritt VII, S.171.

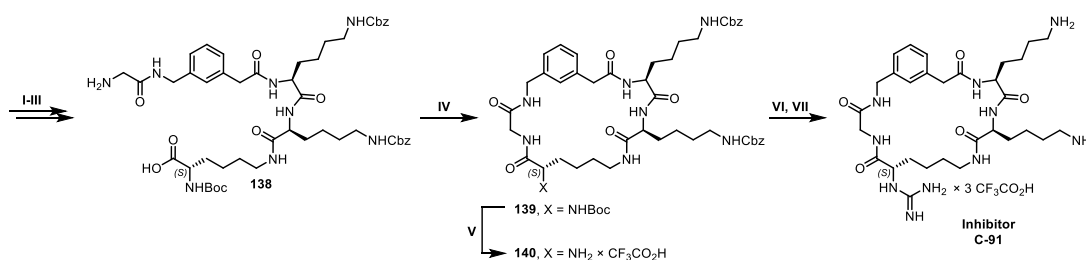
¹H-NMR v. **C-90**: ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,48 (d; $J = 6,7$ Hz; 1H); 8,35 (dd; $J = 6,8$; 4,8 Hz; 1H); 8,17 (t; $J = 6,0$ Hz; 1H); 7,85 – 7,66 (m; 5H); 7,55 (t; $J = 5,6$ Hz; 1H); 7,47 – 7,02^a (br; 7H); 7,24^b (t; $J = 7,6$ Hz; 1H); 7,18 (t; $J = 1,8$ Hz; 1H); 7,11 (ddt; $J = 16,6$; 7,6; 1,5 Hz; 2H); 4,39 – 4,25 (m; 2H); 4,20 – 4,07 (m; 2H); 4,05 – 3,93 (m; 2H); 3,68 – 3,37 (m; 4H); 3,09 – 2,85 (m; 2H); 2,82 – 2,72 (m; 2H); 1,78 – 1,49 (m; 6H); 1,46 – 1,05 (m; 9H); ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*D*₆): δ 171,5; 171,2; 171,1; 170,1; 168,6; 158,3 (q; $J = 31,5$ Hz); 157,9; 156,4; 139,0; 136,1; 128,1; 127,9; 127,8; 125,2; 117,1 (q; $J = 300$ Hz); 53,9; 53,7; 48,2; 42,6; 42,0; 41,9; 38,6; 38,1; 31,6; 30,3; 28,1; 26,6; 22,4; 21,3; 18,0; a,b: s. unter Schritt VII, S.171.

^uReinheit immer > 95 %, wenn nicht anders angegeben. Falls die Reinheit < 95 % ist, ist die Reinheit in Klammern angegeben.

^vAusbeute in [mg], in Klammern darunter die Ausbeute in Prozent über alle Stufen bezogen auf das unbeladene Startharz.

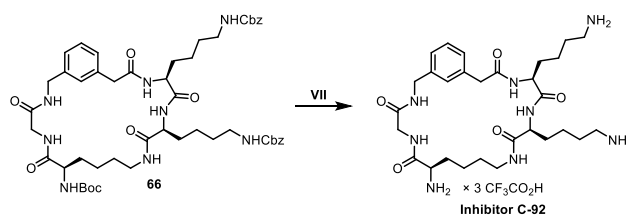
5.3.4 Synthese der P1-modifizierten Inhibitoren C-91 bis C-98

Inhibitor C-91



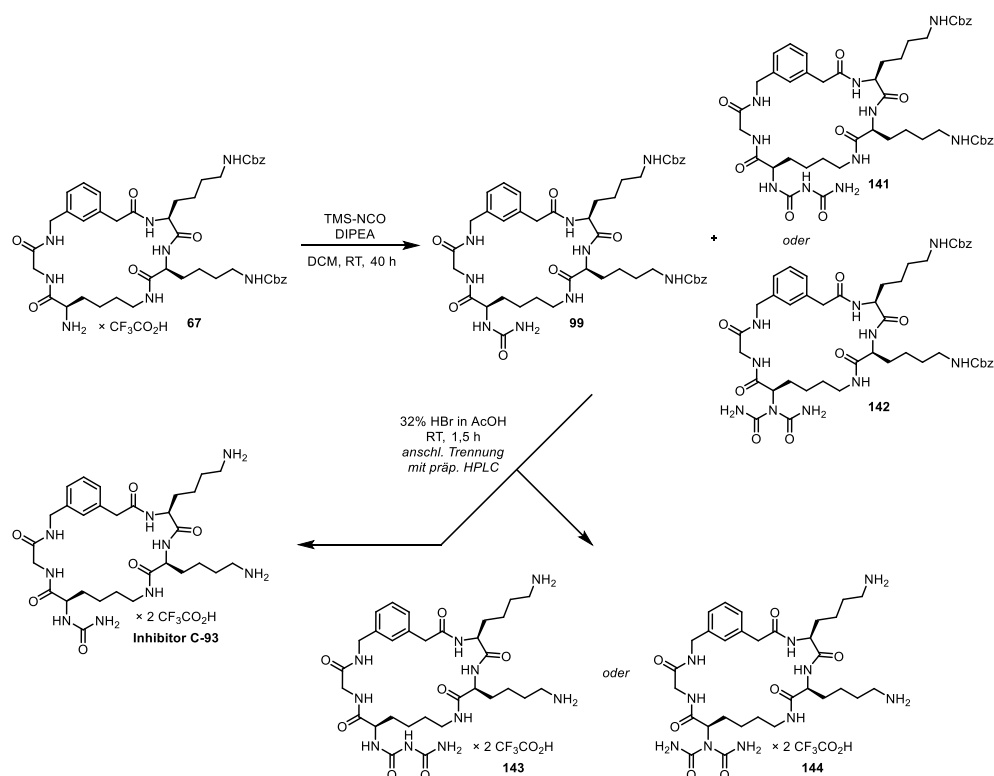
Bei der Synthese des Inhibitors **C-91** wurde im ersten Schritt 2-CTC-Harz mit Boc-L-Lys(Fmoc)-OH beladen. Alle folgenden Schritte wurden analog zur Synthese des Inhibitors **C-8** (vgl. Kapitel 5.3.2, S.165 ff.) durchgeführt. Analytische Daten: **138**: HPLC: 49,5 % B; MS (ESI⁺): ber. 974,51; gef. 975,50 [M+H]⁺; **139**: HPLC: 57,9 % B; **140**: HPLC: 46,4 % B; MS (ESI⁺): ber. 856,45; gef. 857,52 [M+H]⁺; **C-91**: HPLC: 16,9 % B; MS (ESI⁺): ber. 630,40; gef. 631,26 [M+H]⁺; Ausbeute 8,7 mg pro 100 mg Startharz; 5,6 % über alle Stufen ausgehend vom 2-CTC-Harz.

Inhibitor C-92



Der Inhibitor **C-92** mit freier P1-Aminogruppe wurde ausgehend vom Intermediat **66** (aus der Synthese der Leitstruktur, vgl. Schema 3.1, S.123) hergestellt. Dazu wurden die Boc- und Cbz-Schutzgruppen, wie unter Schritt VII in der Synthese des Inhibitors **C-8** beschrieben (vgl. Kapitel 5.3.2, S.165 ff.), mit 32 % HBr in AcOH (m/m; 3,0 mL) vom Intermediat **66** (16,2 mg; 16,7 μ mol; 1,0 Äq.) abgespalten. Nach Reinigung mittels präparativer HPLC wurde **C-92** als farbloses Lyophilisat erhalten (TFA-Salz; 11,9 mg; 12,8 μ mol; 77 % Ausbeute). HPLC: 15,9 % B; MS (ESI⁺): ber. 588,37; gef. 589,42 [M+H]⁺.

Inhibitor C-93

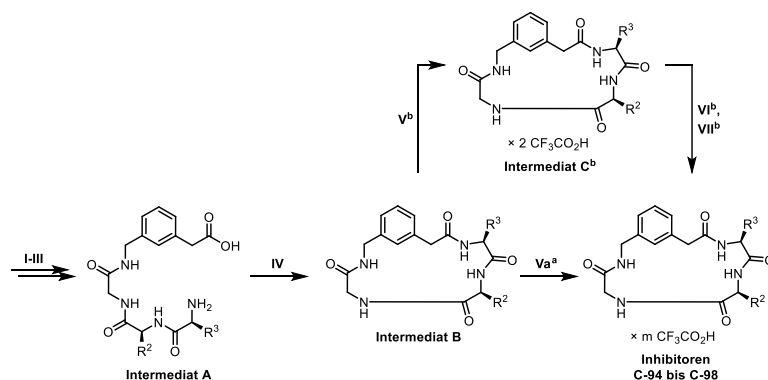


Der Inhibitor **C-93** mit einer P1-Harnstoffgruppe wurde ausgehend vom Intermediat **67** (aus der Synthese der Leitstruktur, vgl. Schema 3.1, S.123) hergestellt: Intermediat **67** (87,0 mg; 89,6 μmol ; 1,0 Äq.; HPLC: 46,7 % B) wurde in DCM (2,0 mL) suspendiert. Unter Rühren wurden TMS-Isocyanat (36,4 μL ; 269 μmol ; 3,0 Äq.) und DIPEA (94,0 μL ; 538 μmol ; 6,0 Äq.) in jeweils einer Portion zugegeben. Dann wurde für 40 h gerührt und anschließend das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Es wurde die Bildung zweier Produkte beobachtet, wobei neben dem Produkt **99** entweder **141** oder **142** als zweifach carbamoyliertes Nebenprodukt entstand (HPLC: 49,0 % B und 49,2 % B; Verhältnis 3:4; es ist unklar, welches HPLC-Signal zu welchem Produkt gehört). Die Cbz-Schutzgruppen des so erhaltenen Rohprodukts wurden wie unter Schritt VII der Synthese des Inhibitors **C-8** beschrieben (vgl. Kapitel 5.3.2, S.165 ff.) mit 32 % HBr in AcOH (m/m; 3,0 mL) abgespalten. Nach Reinigung mittels präparativer HPLC und Lyophilisierung wurde der Inhibitor **C-93** als farbloses Pulver erhalten (TFA-Salz; 15,8 mg; 18,4 μmol ; 21 % Ausbeute über beide Stufen). HPLC: 16,7 % B; MS (ESI⁺): ber. 631,38; gef. 632,25 [M+H]⁺. Als Hauptprodukt wurde eine zweifach carbamoylierte Verbindung isoliert (entweder **143** oder **144**), die ebenfalls als farbloses Pulver erhalten wurde (TFA-Salz; 20,0 mg; 22,2 μmol ; 25 % Ausbeute über beide Stufen). HPLC: 17,2 % B; MS (ESI⁺): ber. 674,39; gef. 675,21 [M+H]⁺. Die Hemmwirkung dieser Verbindung **143** bzw. **144** wurde ebenfalls bestimmt (ZIKV: $K_i = 4,25 \mu\text{M} \pm 0,43 \mu\text{M}$; WNV: $K_i = 70,9 \mu\text{M} \pm 0,6 \mu\text{M}$). Wegen der vergleichsweise niedrigen Hemmwirkung wurde auf weitere Untersuchungen zur Aufklärung der Regiochemie verzichtet.

Inhibitoren C-94 bis C-98

Die Inhibitoren **C-94** bis **C-98** ohne den üblichen P1-Rest wurden analog zur Synthese des linkermodifizierten Inhibitors **C-89** hergestellt (vgl. Kapitel 5.3.3, S.169 ff.). Bei der Synthese der Inhibitoren **C-94** und **C-96** bis **C-98** entfielen jedoch der Guanylierungsschritt (VI) und die Schutzgruppenabspaltung mit HBr in AcOH (VII), da die finalen Inhibitoren direkt nach der Boc-Abspaltung (V) erhalten wurden. Die analytischen Daten der finalen Inhibitoren **C-94** bis **C-98** und der zugehörigen Intermediate sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst.

Tabelle 5.3 Analytische Daten der Inhibitoren **C-94** bis **C-98** und zugehöriger Intermediate. Die Schritte I bis VII entsprechen denen der oben beschriebenen Synthese der Inhibitors **C-89** (vgl. Kapitel 5.3.3, S.169 ff.).



Nr.	P3	P2	Intermediat A		Int. B	Intermediat C		Finaler Inhibitor		
			MS ^c	HPLC [%B]	HPLC [%B]	MS ^c	HPLC [%B]	MS ^c	HPLC [%B]	Ausb. ^j
C-94	Lys ^d	Lys ^d	479,43 (678,40)	40,7	49,9	-	-	461,32 (460,28)	17,4	10,3 (9,4 %)
C-95	Lys ^e	hArg ^f	713,32 (712,38)	43,1	51,8	595,37 (594,32)	36,3	503,24 (502,30)	18,8	20,5 (18 %)
C-96	Lys ^d	Orn ^g	665,51 (664,38)	39,3	49,3	-	-	447,38 (446,26)	17,1	10,0 (9,2 %)
C-97	Lys ^d	Arg ^h	859,45 (858,43)	46,8	55,3	-	-	489,21 (488,29)	18,1	19,6 (17 %)
C-98	Lys ^d	Trp ⁱ	737,45 (736,38)	49,4	61,5	-	-	519,29 (518,62)	28,3	25,2 (25 %)

^aUmsetzung Va (nur bei den Synthesen der Inhibitoren **C-94**, **C-96**, **C-97**, **C-98**): Das nach der Cyclisierung gemäß IV erhaltene Rohprodukt wurde mit TFA (5,0 mL) versetzt und 3 h gerührt. Nach Ablauf der 3 h wurde das Reaktionsgemisch in Et₂O getropft. Ausgefällener Feststoff wurde abzentrifugiert und aus diesem Feststoff mittels präparativer HPLC der jeweilige Inhibitor als farbloses Lyophilisat isoliert.

^bNur bei der Synthese des Inhibitors **C-95**.

^c(ESI⁺), angegeben ist m/z des gef. [M+H]⁺-Signals; die ber. monoisotopische Masse ist in Klammern angegeben.

^{d-i}Präkursoren/Schutzgruppen:

^dIntermediat A,B: Lys(Boc)

^gIntermediat A,B: Orn(Boc)

^eIntermediat A,B,C: Lys(Cbz)

^hIntermediat A,B: Arg(Pbf)

^fIntermediat A,B: Lys(Boc); Intermediat C: Lys

ⁱIntermediat A,B: Trp(Boc)

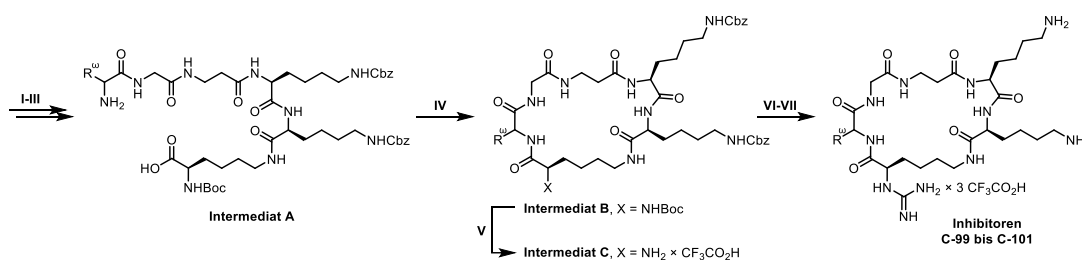
^jAusbeute in [mg], in Klammern darunter die Ausbeute in Prozent über alle Stufen bezogen auf das unbeladene Startharz.

5.3.5 Synthese der kombinierten Inhibitoren C-99 bis C-128

Inhibitoren C-99 bis C-101

Die Inhibitoren **C-99** bis **C-101** ($P\omega$ -modifizierte Derivate des Inhibitors **C-14**) wurden analog zur Synthese des linkermodifizierten Inhibitors **C-89** hergestellt (vgl. Kapitel 5.3.3, S.169 ff.). Die zugehörigen analytischen Daten sind in Tabelle 5.4 zusammengefasst.

Tabelle 5.4 Analytische Daten der Inhibitoren **C-99** bis **C-101** und zugehöriger Intermediate. Die Schritte I bis VII entsprechen denen der oben beschriebenen Synthese des Inhibitors **C-89** (vgl. Kapitel 5.3.3, S.169 ff.). Die Daten des Inhibitors **C-14** sind als Referenz mit aufgeführt.



Nr.	$P\omega$	Intermediat A		Int. B	Intermediat C		Finaler Inhibitor		
		MS ^a	HPLC [%B]	HPLC [%B]	MS ^a	HPLC [%B]	MS ^a	HPLC ^b [%B]	Ausb. ^c
C-14	Gly	956,49 (955,50)	47,1	52,0	838,37 (837,44)	42,8	612,42 (611,39)	11,9	27,4 (18 %)
C-99	D-Cha	1052,75 (1051,60)	52,7	n.b.	934,71 (933,53)	49,1	708,55 (707,48)	24,8 (86,0)	53,1 (32 %)
C-100	D-hCha	1066,77 (1065,61)	53,9	67,1	948,64 (947,55)	51,6	722,52 (721,50)	29,7	36,0 (21 %)
C-101	D-hPhe	1059,56 (1060,78)	51,9	n.b.	942,61 (941,50)	48,3	716,51 (715,45)	22,0	56,8 (34 %)

^a(ESI⁺), angegeben ist m/z des gef. [M+H]⁺-Signals; die ber. monoisotopische Masse ist in Klammern angegeben.

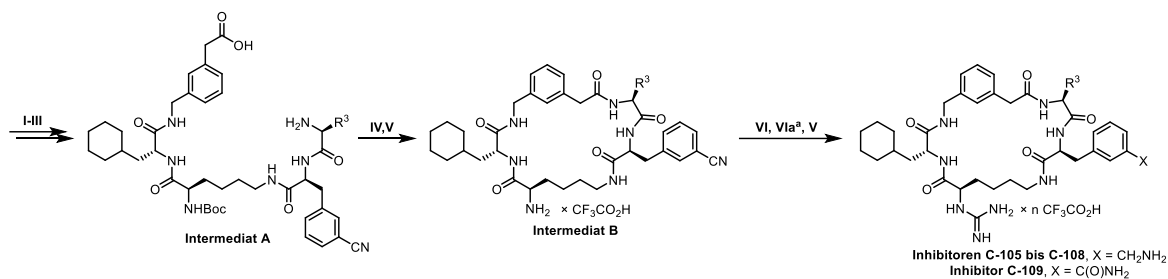
^bReinheit immer > 95 %, wenn nicht anders angegeben. Falls die Reinheit < 95 % ist, ist die Reinheit in Klammern angegeben.

^cAusbeute in [mg], in Klammern darunter die Ausbeute in Prozent über alle Stufen bezogen auf das unbeladene Startharz.

Inhibitoren C-102 bis C-109

Die Inhibitoren **C-102** bis **C-104** wurden von L. C. SCHMACKE im Rahmen ihrer Masterarbeit hergestellt.²⁰⁷ Die Inhibitoren **C-105** bis **C-109** wurden analog zur Synthese des Inhibitors **C-89** hergestellt (vgl. Kapitel 5.3.3, S.169 ff.), allerdings mit einem zusätzlichen Hydrierungsschritt (VIa, analog zur Synthese von **C-73**, s. Anmerkungen unter Tabelle 5.2, S.172 f.) vor der finalen Schutzgruppenabspaltung, um das 3- bzw. 4-Cyano-phenylalanin in das entsprechende Aminomethyl-phenylalanin zu überführen. Die finale Schutzgruppen-abspaltung erfolgte abweichend mit HCl in 1,4-Dioxan (4 M) analog zu Schritt V. Als Präkursor des 3- bzw. 4-Aminomethyl-phenylalanins wurde jeweils das entsprechende Cyanophenylalanin eingesetzt. Im Falle des Inhibitors **C-109** konnte das gewünschte Produkt mit 3-Aminomethylphenylalanin als P2-Rest nicht isoliert werden, es wurde lediglich das entsprechende Carbamoylphenylalanin-Derivat erhalten. Die analytischen Daten sind in Tabelle 5.5 (S.178) zusammengefasst.

Tabelle 5.5 Analytische Daten der Inhibitoren **C-105** bis **C-109** und zugehöriger Intermediate. Die Schritte I bis VI entsprechen denen der oben beschriebenen Synthese des Inhibitors **C-89** (vgl. Kapitel 5.3.3, S.169 ff.).



Nr.	P3	X	Intermediat A		Intermediat B		Finaler Inhibitor		
			MS ^b	HPLC [%B]	MS ^b	HPLC [%B]	MS ^b	HPLC ^f [%B]	Ausb. ^g
C-105	Lys ^c	CH ₂ NH ₂	981,47 (980,54)	50,0	863,46 (862,47)	50,8	775,75 (774,49)	31,3	4,0 (2,2 %)
C-106	Phe(4-CH ₂ NH ₂) ^d	CH ₂ NH ₂	891,42 (890,47)	51,4	773,41 (772,41)	47,5	823,34 (822,49)	33,0	1,8 (0,9 %)
C-107	Phe	CH ₂ NH ₂	866,46 (865,67)	51,5	748,38 (747,41)	48,5	794,50 (793,46)	41,6	21,8 (13 %)
C-108	2-Nal	CH ₂ NH ₂	916,52 (915,49)	54,8	798,44 (797,43)	53,4	844,51 (843,48)	46,2	10,1 (5,9 %)
C-109	Trp ^e	C(O)NH ₂	1005,67 (1004,54)	58,2	787,42 (786,42)	47,7	847,66 (846,45)	49,3	2,2 (1,4 %)

^aUmsetzung VIa: Das nach Umsetzung VI erhaltene Rohprodukt wurde in 25 mL AcOH/H₂O 9:1 (V/V) gelöst, Pd/C (10 %; ca. 100 mg Pd/C pro 1 mmol zu hydrierenden Edukts) wurde zugegeben und die Mischung bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle mittels MS, da wegen der unter HPLC-Bedingungen labilen Boc-Gruppen der Reaktionsfortschritt mit HPLC nicht eindeutig nachzuvollziehen war) unter einer H₂-Atmosphäre gerührt (3 h bis 18 h).

^b(ESI⁺), angegeben ist m/z des gef. [M+H]⁺-Signals; die ber. monoisotopische Masse ist in Klammern angegeben.

^{c-d}Präkursoren/Schutzgruppen:

^cIntermediat A,B: Lys(Cbz)

^dIntermediat A,B: Phe(4-CN)

^eIntermediat A: Trp(Boc)

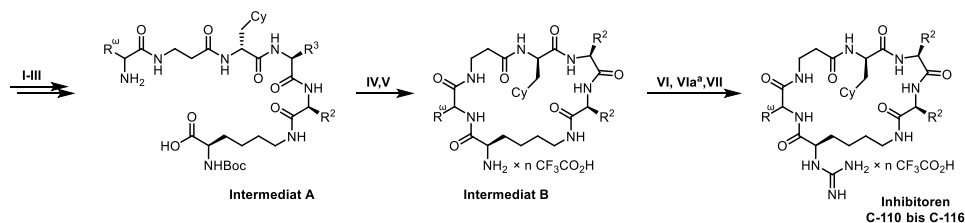
^fReinheit > 95 %.

^gAusbeute in [mg], in Klammern darunter die Ausbeute in Prozent über alle Stufen bezogen auf das unbeladene Startharz.

Inhibitoren C-110 bis C-116

Die Inhibitoren **C-110** bis **C-116** wurden analog zur Synthese des Inhibitors **C-8** synthetisiert (vgl. Kapitel 5.3.2, S.165 ff.); die zugehörigen analytischen Daten sind Tabelle 5.6 zu entnehmen.

Tabelle 5.6 Synthese und analytische Daten der Inhibitoren **C-110** bis **C-116** und zugehöriger Intermediate. Die Schritte I bis VII entsprechen denen der oben beschriebenen Synthese des Inhibitors **C-8** (vgl. Kapitel 5.3.2, S.165 ff.).



Nr.	P ω	P3	P2	Intermediat A		Intermediat B		Finaler Inhibitor		
				MS ^b	HPLC [%B]	MS ^b	HPLC [%B]	MS ^b	HPLC ^f [%B]	Ausb. ^h
C-110	D-Cha	Lys ^d	Lys ^d	1148,92 (1147,69)	61,6	1030,62 (1029,38)	61,0	804,30 (803,57)	36,12	53,1 (32 %)
C-111	D-hCha	Lys ^d	Lys ^d	1162,80 (1161,70)	64,6	1044,80 (1043,64)	63,7	722,52 (721,50)	29,7	41,2 (22 %)
C-112	D-hPhe	Lys ^d	Lys ^d	1156,93 (1155,66)	61,0	1038,82 (1037,59)	60,1	812,67 (811,54)	34,8 (70,0) ^g	57,8 (31 %)
C-113	D-Cha	Lys ^d	Phe(3-CH ₂ NH ₂) ^e	1058,77 (1057,62)	59,2	940,85 (939,56)	58,4	852,48 (851,57)	37,8	16,4 (8,6 %)
C-114	D-Cha	Lys ^d	Phe(3-C(O)NH ₂) ^e	1058,77 (1057,62)	59,2	940,85 (939,56)	58,4	866,42 (865,55)	40,1	3,6 (2,1 %)
C-115	D-Cha	Phe	Phe(3-CH ₂ NH ₂) ^e	943,64 (942,56)	57,9	825,54 (824,49)	57,1	436,46 ^c (870,55)	48,3	2,0 (1,1 %)
C-116	D-Cha	Phe	Phe(3-C(O)NH ₂) ^e	943,64 (942,56)	57,9	825,54 (824,49)	57,1	885,64 (884,53)	58,3	2,6 (1,6 %)

^aUmsetzung VIa (nur bei der Synthese v. **C-113**, **C-114**, **C-115**, **C-116**): Das nach Umsetzung VI erhaltene Rohprodukt wurde in 25 mL AcOH/H₂O 9:1 (V/V) gelöst, Pd/C (10 %; ca. 100 mg Pd/C pro 1 mmol zu hydrierenden Edukts) wurde zugegeben und die Mischung bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle mittels MS) unter einer H₂-Atmosphäre gerührt (3 h bis 18 h).

^b(ESI⁺), wenn nicht anders vermerkt, ist m/z des gef. [M+H]⁺-Signals angegeben; die ber. monoisotopische Masse ist in Klammern angegeben.

^cGef. m/z des [M+2H]²⁺-Signals.

^{d-e}Präkursoren/Schutzgruppen:

^fIntermediat A,B: Lys(Cbz)

^gIntermediat A,B: Phe(4-CN)

^fReinheit immer > 95 %, wenn nicht anders angegeben. Falls die Reinheit < 95 % ist, ist die Reinheit in Klammern angegeben.

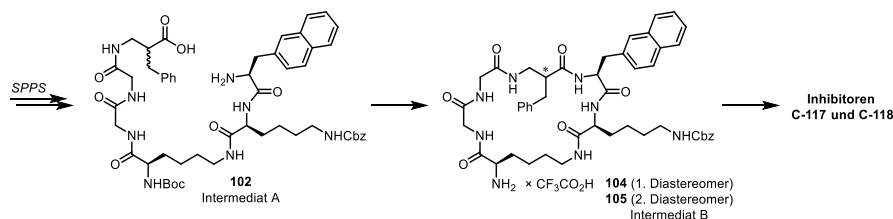
^gDer Inhibitor **C-112** wurde zweimal mit präparativer HPLC gereinigt, bei der augenscheinlich nur die Fraktionen eines einzelnen Signals gesammelt wurden. Bei der Analyse mit analytischer HPLC war sowohl nach der ersten als auch der zweiten Reinigung jeweils die gleiche Verunreinigung vorhanden. Die Ursache dafür ist unklar.

^hAusbeute in [mg], in Klammern darunter die Ausbeute in Prozent über alle Stufen bezogen auf das unbeladene Startharz

Inhibitoren C-117 und C-118

Die Inhibitoren **C-117** und **C-118** wurden analog zur Synthese des Inhibitors **C-89** hergestellt (vgl. Kapitel 5.3.3, S.169 ff.). Allerdings wurde zu Beginn der Fmoc-Festphasensynthese das 2-CTC-Harz mit Fmoc-DL- β^2 -Homophenylalanin beladen. Das lineare Peptid **102** wurde als Diastereomergemisch hergestellt. Nach Cyclisierung und Boc-Abspaltung wurden die Diastereomere **104** und **105** mittels präparativer HPLC voneinander getrennt und dann separat zu den Inhibitoren **C-117** bzw. **C-118** umgesetzt; es ist nicht bekannt, bei welchem der beiden Inhibitoren der P4-Rest D- und bei welchem er L-konfiguriert ist. Die zugehörigen analytischen Daten sind in Tabelle 5.7 zusammengefasst.

Tabelle 5.7 Analytische Daten der Inhibitoren **C-117** und **C-118** und zugehöriger Intermediate.



Nr.	Intermediat A		Intermediat B		Finaler Inhibitor		
	MS ^a	HPLC [%B]	MS ^a	HPLC [%B]	MS ^a	HPLC ^b [%B]	Ausb. ^c
C-117 1. Diastereomer	981,59 (980,50)	49,0	863,24 (862,44)	18,6	771,27 (770,42)	35,8	9,2 (5,8 %)
C-118 2. Diastereomer	981,59 (980,50)	49,0	863,32 (862,44)	19,4	771,17 (770,42)	37,4	9,6 (6,0 %)

^a(ESI⁺), angegeben ist m/z des gef. [M+H]⁺-Signals; die ber. monoisotopische Masse ist in Klammern angegeben.

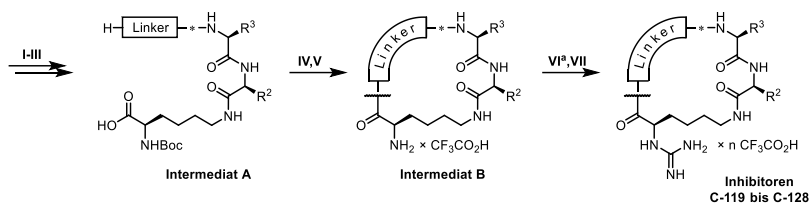
^bReinheit > 95 %.

^cAusbeute in [mg], in Klammern darunter die Ausbeute in Prozent über alle Stufen bezogen auf das unbeladene Startharz

Inhibitoren C-119 bis C-128

Die Inhibitoren **C-119** bis **C-128** wurden analog zur Synthese des Inhibitors **C-8** hergestellt (vgl. Kapitel 5.3.2, S.165 ff.). Im Guanylierungsschritt (VI) wurden die Äquivalente an *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin²³⁵ (4,5 Äq. pro Aminogruppe) und DIPEA (7,5 Äq. pro Aminogruppe) angepasst. Die analytischen Daten der Inhibitoren **C-119** bis **C-128** und der zugehörigen Zwischenstufen sind in Tabelle 5.8 zusammengefasst.

Tabelle 5.8 Analytische Daten der Inhibitoren **C-119** bis **C-128** und zugehöriger Intermediate. Die Schritte I bis VII entsprechen denen der Synthese des Inhibitors **C-8** (vgl. Kapitel 5.3.2, S.165 ff.).



Nr.	P ω	P5	P4	P3	P2	Intermediat A		Intermediat B		Finaler Inhibitor		
						MS ^b	HPLC [%B]	MS ^b	HPLC [%B]	MS ^b	HPLC ^h [%B]	Ausb. ⁱ
C-119	D-hCha	–	3-Amphac	Arg ^d	Arg ^d	989,82 (988,62)	54,4	671,55 (670,45)	34,4	399,38 ^c (796,52)	35,6	41,1 (23 %)
C-120	Phe	2-Nal	Arg ^d	Arg ^d	Arg ^d	1233,79 (1232,71)	58,2	815,40 (814,49)	33,1	492,47 ^c (982,57)	34,7	23,2 (10 %)
C-121	D-Phe	2-Nal	Arg ^d	Arg ^d	Arg ^d	1233,84 (1232,71)	60,8	815,60 (814,49)	32,8	492,35 ^c (982,57)	35,4	27,1 (12 %)
C-122	D-hCha	2-Nal	Arg ^d	Arg ^d	Arg ^d	1253,90 (1252,77)	65,7	835,72 (834,55)	38,7	502,42 ^c (1002,64)	41,3	54,5 (23 %)
C-123	D-Phe	Phe	Arg ^d	Arg ^d	Arg ^d	1183,87 (1182,69)	57,7	765,24 (764,47)	28,2	467,37 ^c (932,56)	30,7	59,0 (27 %)
C-124	D-hCha	Lys ^e	Cha	Lys ^e	Cha	1244,80 (1243,78)	69,6	1126,88 (1125,72)	66,5	900,30 (899,67)	41,4	24,7 (12 %)
C-125	D-hCha	Arg ^d	Cha	Lys ^e	Cha	1196,82 (1195,78)	68,6	978,75 (977,67)	50,7	465,00 ^c (927,67)	41,4	43,3 (21 %)
C-126	D-hCha	Lys ^e	Phe	Lys ^e	Cha	1238,92 (1237,74)	67,3	n.b.	53,7	894,55 (893,62)	39,6	36,1 (18 %)
C-127	D-hCha	Arg ^d	Phe	hArg ^f	Cha	1190,90 (1189,74)	66,3	838,67 (837,58)	35,4	482,98 ^c (963,65)	39,3	4,8 (2,3 %)
C-128	D-hCha	D-Arg ^g	Phe	hArg ^f	Cha	1190,83 (1189,74)	65,4	838,64 (837,58)	39,5	483,00 ^c (963,65)	43,0	3,5 (1,7 %)

^aUmsetzung VI bei den Synthesen v. **C-125**: 9,0 Äq. *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin, 15,0 Äq. DIPEA; bei den Synthesen v. **C-119**, **C-127**, **C-128**: 13,5 Äq. *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin, 22,5 Äq. DIPEA; bei den Synthesen v. **C-120** bis **C-123**: 18,0 Äq. *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin, 30,0 Äq. DIPEA; sonst analog zur Synthese v. **C-89**.

^b(ESI⁺), wenn nicht anders vermerkt, ist m/z des gef. [M+H]⁺-Signals angegeben; die ber. monoisotopische Masse ist in Klammern angegeben.

^cGef. m/z des [M+2H]²⁺-Signals.

^{d-f}Präkursoren/Schutzgruppen:

^dIntermediat A: Orn(Boc); Intermediat B: Orn × CF₃CO₂H

^eIntermediat A,B: Lys(Cbz)

^fIntermediat A: Lys(Cbz); Intermediat B: Lys × CF₃CO₂H

^gIntermediat A: D-Orn(Boc); Intermediat B: D-Orn × CF₃CO₂H

^hReinheit immer > 95 %.

ⁱAusbeute in [mg], in Klammern darunter die Ausbeute in Prozent über alle Stufen bezogen auf das unbeladene Startharz

5.3.6 Synthese der Boroleucin-basierten Inhibitoren **B-1** bis **B-8**

Die Inhibitoren **B-1** bis **B-8** wurden durch Kombination von Festphasenpeptidsynthese und einigen darauffolgenden Schritten in Lösung hergestellt. An dieser Stelle sei nun die Synthese des Inhibitors **B-5** im Detail beschrieben (vgl. Schema 3.22, S.143). Die Inhibitoren **B-1** bis **B-4** und **B-6** bis **B-8** wurden auf gleiche Weise hergestellt, abgesehen natürlich von der Verwendung anderer Aminosäurebausteine in der Festphasenpeptidsynthese. Die analytischen Daten der Inhibitoren **B-1** bis **B-8** und der zugehörigen Intermediate sind in Tabelle 5.9 (S.184) zusammengefasst.

Synthese des Inhibitors **B-5**

I. Harzbeladung. Fmoc-Lys(Boc)-OH (750 mg; 1,60 mmol; 1,0 Äq.) und DIPEA (1,10 mL; 6,40 mmol; 4,0 Äq.) wurden in trockenem DCM (10 mL) gelöst. Diese Lösung wurde auf 2-CTC-Harz (b = 1,60 mmol/g; 1,00 g; 1,60 mmol; 1,0 Äq.) gegeben. Nachdem diese Mischung 2 h geschüttelt worden war, wurde die Lösung abfiltriert. Das zurückbleibende Harz wurde mit DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1 V/V/V; 3,0 mL; 3×1 min) behandelt, anschließend mit DCM (2×), DMF (3×) und DCM (4×) gewaschen und dann *in vacuo* getrocknet.

IIa. Fmoc-Festphasenpeptidsynthese. Das nach I. erhaltene Harz wurde mit DMF gewaschen (2×) und anschließend zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit einer Lösung von Piperidin in DMF (20 % V/V; 1×5 min und 1×15 min, je 10 mL) behandelt. Anschließend wurde das Harz mit DMF gewaschen (8×) und dann mit einer Lösung von Fmoc-Lys(Boc)-OH (2,25 g; 4,80 mmol; 3,0 Äq.), HATU (1,83 g; 4,80 mmol; 3,0 Äq.) und DIPEA (1,65 mL; 9,60 mmol; 6,0 Äq.) in DMF (10 mL) versetzt und 1,5 h geschüttelt. Dann wurde das Lösungsmittel abfiltriert und das zurückbleibende Harz mit DMF gewaschen (2×). Die folgende Fmoc-Aminosäure (Fmoc-3-Amphac-OH) wurde unter Anwendung der gleichen Prozedur gekuppelt. Nach dieser Kupplung wurde noch zweimal mit DMF gewaschen und dann zur Entfernung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe mit einer Lösung von Piperidin in DMF (20 % V/V; 1×5 min und 1×15 min, je 3,0 mL) behandelt, mit DMF (8×) und DCM (3×) gewaschen und dann *in vacuo* getrocknet.

Ein Drittel des so erhaltenen Harzes (ca. 0,53 mmol; 1,0 Äq.) wurde mit DMF gewaschen (4×). Dann wurde unter analogen Bedingungen (mit gleichen Überschüssen, aber angepassten Stoffmengen) wie oben für Fmoc-Lys(Boc)-OH beschrieben Fmoc-D-Ala-OH gekuppelt. Nach dieser Kupplung wurde noch zweimal mit DMF gewaschen und dann zur Entfernung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe mit einer Lösung von Piperidin in DMF (20 % V/V; 1×5 min und 1×15 min, je 3,0 mL) behandelt, wonach erneut mit DMF gewaschen wurde (8×).

Iib. Überführung des Amins in ein zweifach Boc-geschütztes Guanidin an der festen Phase. Das nach Iia erhaltene Harz wurde 18 h mit einer Lösung von *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin²³⁵ (497 mg; 1,60 mmol; 3,0 Äq.) und DIPEA (550 µL; 3,20 mmol; 6,0 Äq.) in DMF (3,0 mL) behandelt. Dann wurde die Lösung abfiltriert und das zurückbleibende Harz mit DMF (8×) gewaschen.

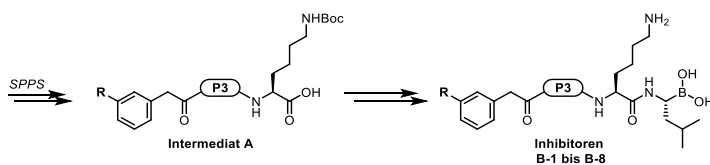
III. Mild-saure Abspaltung vom Harz. Das nach Iib erhaltene Harz wurde mit DCM gewaschen (3×) und dann 30 min mit einer Lösung von TFA in DCM (1 % V/V; 3,0 mL) behandelt. Dann wurde die Lösung abfiltriert und der pH-Wert des Filtrats mit DIPEA auf > 7 eingestellt. Das zurückbleibende Harz wurde noch drei weitere Male auf gleiche Weise mit 1 % TFA in DCM behandelt, wobei das nach Ablauf der 30 min erhaltene Filtrat immer sofort mit DIPEA auf pH > 7 eingestellt wurde. Im Anschluss wurde das Harz mit DCM (3×) gewaschen. Diese Waschphasen und die vier Filtrate wurden vereint und (sofern nötig) mit DIPEA erneut auf pH > 7 eingestellt. Die so erhaltene Lösung wurde bei vermindertem Druck eingeeengt, wonach das Boc-geschützte Peptid **125** als Rohprodukt erhalten wurde (HPLC: 64,7 % B; MS (ESI⁺): ber. 934,54; gef. 935,47 [M+H]⁺).

IV. Intermolekulare HATU-Kupplung. Das nach III erhaltene Peptid **125** wurde in DMF (5,0 mL) gelöst. Nach Zugabe von HATU (232 mg; 0,61 mmol; 1,15 Äq.) und DIPEA (370 µL; 2,13 mmol; 4,0 Äq.) wurde 15 min gerührt. Dann wurde (*R*)-Boroleucin-(1*S*,2*S*,3*R*,5*S*)-(+)-2,3-pinandiolester-trifluoroacetat (231 mg; 0,61 mmol; 1,15 Äq.) in einer Portion zugegeben und die entstandene Mischung 1 h gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, wonach das Rohprodukt **128** als öliges Rückstand erhalten wurde.

V. Selektive Boc-Abspaltung in Gegenwart eines Boronsäure-Pinandiolesters. Das nach IVa erhaltene Rohprodukt **128** wurde mit HCl in 1,4-Dioxan (4 M; 5,0 mL) versetzt und 3 h gerührt. Im Laufe der Reaktion wurde eine Trübung der zu Beginn der Reaktion klaren Mischung beobachtet. Nach Ablauf der 3 h wurde das Reaktionsgemisch in Et₂O getropft. Ausgefallener Feststoff wurde abzentrifugiert und aus diesem Feststoff mittels präparativer HPLC das Peptid **129** isoliert (TFA-Salz; HPLC: 36,8 % B; MS (ESI⁺): ber. 781,54; gef. 782,47 [M+H]⁺).

VI. Pinandiol-Abspaltung. Das nach V erhaltene Peptid **129** und Isobutylboronsäure (109 mg; 1,07 mmol; 2,0 Äq.) wurden in einer Mischung aus Salzsäure (1 M; 0,5 mL), MeOH (3,8 mL) und Pentan (3,8 mL) gelöst und anschließend 18 h gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und aus dem Rohprodukt mittels präparativer HPLC der Inhibitor **B-5** als farbloses Lyophilisat mit charakteristischem Boronsäuregeruch isoliert (TFA-Salz; 23,0 mg; 23,2 µmol, 4 % Ausbeute über alle Schritte).

Tabelle 5.9 Analytische Daten der Inhibitoren **B-1** bis **B-8** und zugehöriger Intermediate.



Nr.	R ^a	P3	Intermediat A		Finaler Inhibitor		
			MS ^d	HPLC ^g [%B]	MS ^d	HPLC ^h [%B]	Ausb. ⁱ
B-1		Lys ^b	978,56 (977,54)	58,9	691,29 (690,43)	19,7	1,4 (0,9 %)
B-2		Lys ^b	836,48 (835,47)	51,8	671,33 ^e (648,41)	20,6	1,9 (1,2 %)
B-3		Lys ^b	921,46 (920,52)	61,8	634,50 (633,41)	19,8 (90,1)	6,9 (4,4 %)
B-4		Lys ^b	935,50 (934,54)	64,6	648,70 (647,43)	20,8 (93,0)	4,8 (3,0 %)
B-5		Lys ^b	935,47 (934,54)	64,7	648,50 (647,43)	20,7	6,9 (4,4 %)
B-6		Lys ^b	935,53 (934,54)	59,3	648,27 (647,43)	20,9	2,3 (1,5 %)
B-7		Lys ^b	593,33 (592,35)	55,3	506,40 (505,34)	17,6 (80,0)	18,9 (16 %)
B-8		Arg ^c	1115,40 (1114,57)	55,8	338,97 ^f (675,44)	22,7 (77,0)	16,8 (10 %)

^aAuf der Stufe des Intermediats A waren *N*-terminale Guanidinogruppen zweifach Boc-geschützt und *N*-terminale Aminogruppen Boc-geschützt.

^{b-c}Präkursoren/Schutzgruppen:

^bIntermediat A: Lys(Boc)

^cIntermediat A: Arg(Pbf)

^d(ESI⁺), wenn nicht anders vermerkt, ist *m/z* des gef. [M+H]⁺-Signals angegeben; die ber. monoisotopische Masse ist in Klammern angegeben.

^eGef. *m/z* des [M+Na]⁺-Signals.

^fGef. *m/z* des [M+2H]²⁺-Signals.

^gDie Boc-Gruppen des *N*-terminalen Guanidins sind unter HPLC-Bedingungen (0,1 % TFA) labil. Daher wurden neben dem angegebenen Signal i.d.R. noch ein weiteres, hydrophileres Signal detektiert.

^hReinheit immer > 95 %, wenn nicht anders angegeben. Falls die Reinheit < 95 % ist, ist die Reinheit in Klammern angegeben.

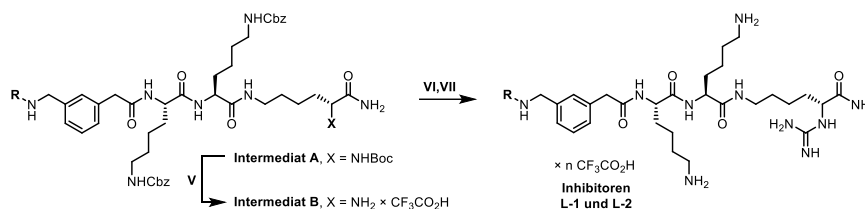
ⁱAusbeute in [mg], in Klammern darunter die Ausbeute in Prozent über alle Stufen bezogen auf das unbeladene Startharz.

5.3.7 Synthese der linearen Referenzinhibitoren L-1 bis L-6

Inhibitoren L-1 und L-2

Die Vorstufen der Inhibitoren **L-1** und **L-2** wurden an einem Sieber-Amid-Harz ($b = 0.69$ mmol/g) nach einem Standard-Fmoc-Protokoll analog zur Synthese des Inhibitors **C-8** (Schritt II, vgl. Kapitel 5.3.2, S.165 ff.) hergestellt. Bei der Synthese des Inhibitors **L-1** wurde als letzter Baustein Fmoc-Gly(Cbz)-OH gekuppelt, bei der Synthese von **L-2** AcOH. Anschließend wurde das Peptid analog zu den Schritten der Synthese des Inhibitors **C-8** mit TFA in DCM (1 % V/V) vom Harz abgespalten (Schritt III), die Boc-Gruppe des P1-Rests mit HCl in 1,4-Dioxan abgespalten (Schritt V), das P1-Amin in ein zweifach Boc-geschütztes Guanidin überführt (Schritt VI) und dann final entschützt (Schritt VII), wonach die Inhibitoren **L-1** und **L-2** jeweils als farbloses, hygroskopisches Pulver erhalten wurden (TFA-Salz). Die analytischen Daten zeigt Tabelle 5.10.

Tabelle 5.10 Analytische Daten der Inhibitoren **L-1** und **L-2** und zugehöriger Intermediate.



Nr.	R ^a	Intermediat A		Intermediat B		Finaler Inhibitor		
		MS ^b	HPLC [%B]	MS ^b	HPLC [%B]	MS ^b	HPLC ^c [%B]	Ausb. ^d
L-1		n.b.	60,4	1008,53 (1007,51)	51,2	648,53 (647,42)	14,5 (68,0)	12,3 (9,3 %)
L-2		959,50 (958,52)	54,2	n.b.	45,1	633,68 (632,41)	16,6	35,5 (30 %)

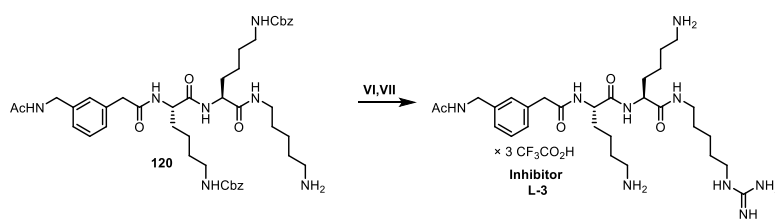
^aAuf der Stufe der Intermediate A und B der Synthese des Inhibitors **L-1** war die N-terminale Aminogruppe Cbz-geschützt.

^b(ESI⁺), wenn nicht anders vermerkt, ist m/z des gef. [M+H]⁺-Signals angegeben; die ber. monoisotopische Masse ist in Klammern angegeben.

^cReinheit immer > 95 %, wenn nicht anders angegeben. Falls die Reinheit < 95 % ist, ist die Reinheit in Klammern angegeben.

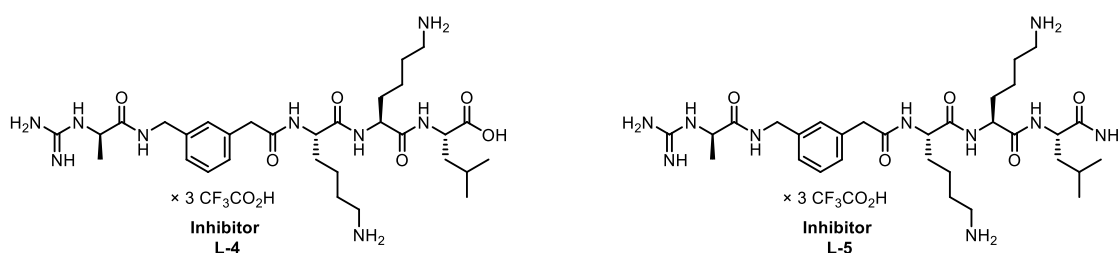
^dAusbeute in [mg], in Klammern darunter die Ausbeute in Prozent über alle Stufen bezogen auf das unbeladene Startharz.

Inhibitor L-3



Der Präkursor **120** des Inhibitors **L-3** wurde an einem Trityl-Harz hergestellt. Dazu wurde Tritylchlorid-Harz ($b = 1,20 \text{ mmol/g}$; 266 mg ; $319 \text{ } \mu\text{mol}$; $1,0 \text{ } \ddot{\text{A}}\text{q.}$) für 2 h mit einer Lösung von Cadaverin ($226 \text{ } \mu\text{L}$; $1,91 \text{ mmol}$; $6,0 \text{ } \ddot{\text{A}}\text{q.}$) in DCM ($2,0 \text{ mL}$) behandelt. Dann wurde die Lösung abfiltriert und das zurückbleibende Harz mit DCM/MeOH/DIPEA ($17:2:1 \text{ V/V/V}$; $3,0 \text{ mL}$; $3 \times 1 \text{ min}$) behandelt, anschließend mit DCM ($2 \times$), DMF ($3 \times$) und DCM ($4 \times$) gewaschen und dann *in vacuo* getrocknet. Dann wurde analog zu den Schritten der Synthese des Inhibitors **C-8** (vgl. Kapitel 5.3.2, S.165 ff.) das Präkursorpeptid mittels Festphasenpeptidsynthese aufgebaut (Schritt II), das anschließend mit TFA in DCM ($1 \text{ } \%$ V/V) vom Harz abgespalten (Schritt III) wurde (**120**: HPLC: $45,7 \text{ } \%$ B; MS (ESI⁺): ber. $815,46$; gef. $816,35 \text{ [M+H]}^+$). Dann wurde analog zur Synthese des Inhibitors **C-8** die C-terminale Aminogruppe in ein zweifach Boc-geschütztes Guanidin überführt (Schritt VI). Nach Abspaltung aller Schutzgruppen mit $32 \text{ } \%$ HBr in AcOH (Schritt VII) wurde der Inhibitor **L-3** als farbloses, hygroskopisches Lyophilisat erhalten (TFA-Salz; Ausbeute $94,8 \text{ mg}$; $101 \text{ } \mu\text{mol}$; $32 \text{ } \%$ über alle Stufen ausgehend vom unbeladenen Tritylchlorid-Harz). HPLC: $18,2 \text{ } \%$ B; MS (ESI⁺): ber. $589,41$; gef. $590,46 \text{ [M+H]}^+$.

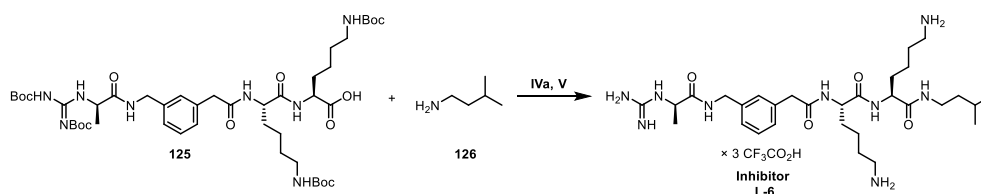
Inhibitoren L-4 und L-5



Die Inhibitoren **L-4** und **L-5** wurden zur Gänze an der festen Phase synthetisiert; die Synthese von **L-4** erfolgte ausgehend von einem 2-CTC-Harz, die Synthese von **L-5** ausgehend von einem Fmoc-Sieber-Amid-Harz. Harzbeladung und die anschließende Festphasenpeptidsynthese erfolgte bei **L-4** analog zur Synthese des Inhibitors **C-8** (Schritte I und II, vgl. Kapitel 5.3.2, S.165 ff.); bei der Synthese von **L-5** wurden die Bausteine sukzessive nach einem Standard-Fmoc-Protokoll an ein Sieber-Amid-Harz ($b = 0,69 \text{ mmol/g}$) gekuppelt. Als Baustein zur Einführung des P3- und des P2-Lysins wurde jeweils Fmoc-Lys(Boc)-OH verwendet. Nach der Kupplung von Fmoc-D-Ala-OH und der finalen Fmoc-

Abspaltung erfolgte die Überführung des freien *N*-Terminus in ein zweifach Boc-geschütztes Guanidin an der festen Phase analog zum Schritt IIa der Synthese des Inhibitors **B-5** (vgl. Kap. 5.3.6, S.182 f.). Dann wurde das Harz 3 h mit TFA/TIS/H₂O (95:2,5:2,5 V/V/V) behandelt, wodurch simultan das Peptid vom Harz und die Boc-Schutzgruppen vom Peptid abgespalten wurden. Nach den 3 h wurde das Reaktionsgemisch in Et₂O getropft. Ausgefallener Feststoff wurde abzentrifugiert und aus diesem Feststoff mittels präparativer HPLC der Inhibitoren **L-4** bzw. **L-5** jeweils als farbloses Lyophilisat isoliert (TFA-Salz). Inhibitor **L-4**: Ausbeute 94,6 mg pro 100 mg 2-CTC-Harz; 60 % über alle Stufen; HPLC: 21,7 % B; MS (ESI⁺): ber. 647,41; gef. 648,38 [M+H]⁺; Inhibitor **L-5**: Ausbeute 89,1 mg pro 100 mg Tritylchlorid-Harz; 75 % über alle Stufen; HPLC: 20,0 % B; MS (ESI⁺): ber. 646,43; gef. 647,51 [M+H]⁺.

Inhibitor L-6



Der Inhibitor **L-6** wurde durch Kupplung von Isopentylamin (**126**) an das geschützte Peptid **125** und anschließende Boc-Abspaltung hergestellt. Das Peptid **125** wurde wie in der Synthese des Inhibitors **B-5** beschrieben hergestellt (vgl. Kap. 5.3.6, S.182 f.). Das erhaltene Peptid **125** wurde analog zum Schritt IVa der Synthese des Inhibitors **B-5** mit HATU und DIPEA an Isopentylamin gekuppelt. Das erhaltene Rohprodukt wurde analog zu Schritt V der Synthese des Inhibitors **C-8** (vgl. Kapitel 5.3.2, S.165 ff.) in den Inhibitor **L-6**, der nach präparativer HPLC als farbloses Lyophilisat (TFA-Salz) isoliert wurde, überführt. Ausbeute 20,6 mg pro 100 mg 2-CTC-Harz; 14 % über alle Stufen; HPLC: 25,7 % B; Reinheit (HPLC): 86,0 %; MS (ESI⁺): ber. 603,42; gef. 302,82 [M+2H]²⁺.

6 Literaturverzeichnis

1. I. Schechter, A. Berger, On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* **1967**, *27* (2), 157-162.
2. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. *Eur J Biochem* **1984**, *138* (1), 9-37.
3. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.4 Schrödinger, LLC.*
4. *Inkscape, Version 1.1, Inkscape-Entwicklerteam 2021.*
5. *ChemDraw, Version 19.1, PerkinElmer Informatics, Inc.*
6. P. Simmonds, P. Becher, J. Bukh, E.A. Gould, G. Meyers, T. Monath, S. Muerhoff, A. Pletnev, R. Rico-Hesse, D.B. Smith, J.T. Stapleton, C. Ictv Report, ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *J Gen Virol* **2017**, *98* (1), 2-3.
7. M.S. Mustafa, V. Rasotgi, S. Jain, V. Gupta, Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Med J Armed Forces India* **2015**, *71* (1), 67-70.
8. D. Normile, Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science* **2013**, *342* (6157), 415.
9. S. Bhatt, P.W. Gething, O.J. Brady, J.P. Messina, A.W. Farlow, C.L. Moyes, J.M. Drake, J.S. Brownstein, A.G. Hoen, O. Sankoh, M.F. Myers, D.B. George, T. Jaenisch, G.R. Wint, C.P. Simmons, T.W. Scott, J.J. Farrar, S.I. Hay, The global distribution and burden of dengue. *Nature* **2013**, *496* (7446), 504-507.
10. S.B. Halstead, Dengue. *Lancet* **2007**, *370* (9599), 1644-1652.
11. H. Wang, G. Liang, Epidemiology of Japanese encephalitis: past, present, and future prospects. *Ther Clin Risk Manag* **2015**, *11*, 435-448.
12. T.F. Tsai, New initiatives for the control of Japanese encephalitis by vaccination: minutes of a WHO/CVI meeting, Bangkok, Thailand, 13-15 October 1998. *Vaccine* **2000**, *18 Suppl 2*, 1-25.
13. P. Bogovic, F. Strle, Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World J Clin Cases* **2015**, *3* (5), 430-441.
14. D. Ruzek, T. Avšič Županc, J. Borde, A. Chrdle, L. Eyer, G. Karganova, I. Kholodilov, N. Knap, L. Kozlovskaya, A. Matveev, A.D. Miller, D.I. Osolodkin, A.K. Överby, N. Tikunova, S. Tkachev, J. Zajkowska, Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines. *Antiviral Res* **2019**, *164*, 23-51.
15. E.B. Hayes, N. Komar, R.S. Nasci, S.P. Montgomery, D.R. O'Leary, G.L. Campbell, Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis* **2005**, *11* (8), 1167-1173.
16. C. Chancey, A. Grinev, E. Volkova, M. Rios, The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *Biomed Res Int* **2015**, *2015*, 376230.
17. T. Garske, M.D. Van Kerkhove, S. Yactayo, O. Ronveaux, R.F. Lewis, J.E. Staples, W. Perea, N.M. Ferguson, Yellow Fever in Africa: estimating the burden of disease and impact of mass vaccination from outbreak and serological data. *PLoS Med* **2014**, *11* (5), e1001638.
18. A.D. Barrett, S. Higgs, Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. *Annu Rev Entomol* **2007**, *52*, 209-229.
19. G.A. Calvet, F.B. Santos, P.C. Sequeira, Zika virus infection: epidemiology, clinical manifestations and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis* **2016**, *29* (5), 459-466.
20. V. Sharma, M. Sharma, D. Dhull, Y. Sharma, S. Kaushik, S. Kaushik, Zika virus: an emerging challenge to public health worldwide. *Can J Microbiol* **2020**, *66* (2), 87-98.
21. P. Brasil, J.P. Pereira, Jr., M.E. Moreira, R.M. Ribeiro Nogueira, L. Damasceno, M. Wakimoto, R.S. Rabello, S.G. Valderramos, U.A. Halai, T.S. Salles, A.A. Zin, D. Horovitz, P. Daltro, M. Boechat, C. Raja Gabaglia, P. Carvalho de Sequeira, J.H. Pilotto, R. Medialdea-Carrera, D. Cotrim da Cunha, L.M. Abreu de Carvalho, M. Pone, A. Machado Siqueira, G.A. Calvet, A.E. Rodrigues Baião, E.S. Neves, P.R. Nassar de Carvalho, R.H. Hasue, P.B. Marschik, C. Einspieler, C. Janzen, J.D. Cherry, A.M. Bispo de Filippis, K. Nielsen-Saines, Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med* **2016**, *375* (24), 2321-2334.
22. P.L. Wildy, Classification and nomenclature of viruses. First report of the International Committee on Nomenclature of Viruses. *Monographs in Virology* **1971**, *5*, 1-81.
23. B.J. Blitvich, A.E. Firth, A Review of Flaviviruses that Have No Known Arthropod Vector. *Viruses* **2017**, *9* (6).
24. N. Vasilakis, S.C. Weaver, Flavivirus transmission focusing on Zika. *Curr Opin Virol* **2017**, *22*, 30-35.
25. A. Valderrama, Y. Díaz, S. López-Vergès, Interaction of Flavivirus with their mosquito vectors and their impact on the human health in the Americas. *Biochem Biophys Res Commun* **2017**, *492* (4), 541-547.
26. M.J. Valentine, C.C. Murdock, P.J. Kelly, Sylvatic cycles of arboviruses in non-human primates. *Parasit Vectors* **2019**, *12* (1), 463.
27. P.S. Pandit, M.M. Doyle, K.M. Smart, C.C.W. Young, G.W. Drape, C.K. Johnson, Predicting wildlife reservoirs and global vulnerability to zoonotic Flaviviruses. *Nat Commun* **2018**, *9* (1), 5425.
28. S. Lequime, R.E. Paul, L. Lambrechts, Determinants of Arbovirus Vertical Transmission in Mosquitoes. *PLoS Pathog* **2016**, *12* (5), e1005548.
29. J. Süss, Tick-borne encephalitis 2010: epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia-an overview. *Ticks Tick Borne Dis* **2011**, *2* (1), 2-15.
30. T. Evans-Gilbert, Vertically transmitted chikungunya, Zika and dengue virus infections: The pathogenesis from mother to fetus and the implications of co-infections and vaccine development. *Int J Pediatr Adolesc Med* **2020**, *7* (3), 107-111.
31. A.E. Ades, A. Soriano-Arandes, A. Alarcon, F. Bonfante, C. Thorne, C.S. Peckham, C. Giaquinto, Vertical transmission of Zika virus and its outcomes: a Bayesian synthesis of prospective studies. *Lancet Infect Dis* **2021**, *21* (4), 537-545.
32. P.S. Mead, S.L. Hills, J.T. Brooks, Zika virus as a sexually transmitted pathogen. *Curr Opin Infect Dis* **2018**, *31* (1), 39-44.
33. F. Mostashari, M.L. Bunning, P.T. Kitsutani, D.A. Singer, D. Nash, M.J. Cooper, N. Katz, K.A. Liljebjelke, B.J. Biggerstaff, A.D. Fine, M.C. Layton, S.M. Mullin, A.J. Johnson, D.A. Martin, E.B. Hayes, G.L. Campbell, Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: results of a household-based seroepidemiological survey. *Lancet* **2001**, *358* (9278), 261-264.
34. M.M. Haby, M. Pinart, V. Elias, L. Reveiz, Prevalence of asymptomatic Zika virus infection: a systematic review. *Bull World Health Organ* **2018**, *96* (6), 402-413d.
35. I. Rafique, M.A.N. Saqib, M.A. Munir, H. Qureshi, I.U. Taseer, R. Iqbal, W. Ahmed, T. Akhtar, Rizwanullah, Asymptomatic dengue infection in adults of major cities of Pakistan. *Asian Pac J Trop Med* **2017**, *10* (10), 1002-1006.
36. M.A. Johansson, P.F. Vasconcelos, J.E. Staples, The whole iceberg: estimating the incidence of yellow fever virus infection from the number of severe cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **2014**, *108* (8), 482-487.
37. U. Dumpis, D. Crook, J. Oksi, Tick-borne encephalitis. *Clin Infect Dis* **1999**, *28* (4), 882-890.
38. E. McDonald, S. Mathis, S.W. Martin, J.E. Staples, M. Fischer, N.P. Lindsey, Surveillance for West Nile Virus Disease - United States, 2009-2018. *MMWR Surveill Summ* **2021**, *70* (1), 1-15.
39. R.A. Soto, M.L. Hughes, J.E. Staples, N.P. Lindsey, West Nile Virus and Other Domestic Nationally Notifiable Arboviral Diseases - United States, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **2022**, *71* (18), 628-632.

40. L.V. Simon, D.S. Sandhu, A. Goyal, B. Kruse, Japanese Encephalitis. In *StatPearls*, StatPearls Publishing, Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL), 2022.
41. L. Lindquist, O. Vapalahti, Tick-borne encephalitis. *Lancet* **2008**, *371* (9627), 1861-1871.
42. G.L. Campbell, S.L. Hills, M. Fischer, J.A. Jacobson, C.H. Hoke, J.M. Hombach, A.A. Marfin, T. Solomon, T.F. Tsai, V.D. Tsu, A.S. Ginsburg, Estimated global incidence of Japanese encephalitis: a systematic review. *Bull World Health Organ* **2011**, *89* (10), 766-774, 774a-774e.
43. F.F. Amâncio, T.P. Heringer, C. de Oliveira Cda, L.B. Fassy, F.B. de Carvalho, D.P. Oliveira, C.D. de Oliveira, F.O. Botoni, C. Magalhães Fdo, J.R. Lambertucci, M. Carneiro, Clinical Profiles and Factors Associated with Death in Adults with Dengue Admitted to Intensive Care Units, Minas Gerais, Brazil. *PLoS One* **2015**, *10* (6), e0129046.
44. R.C. Pinto, D.B. Castro, B.C. Albuquerque, S. Sampaio Vde, R.A. Passos, C.F. Costa, M. Sadahiro, J.U. Braga, Mortality Predictors in Patients with Severe Dengue in the State of Amazonas, Brazil. *PLoS One* **2016**, *11* (8), e0161884.
45. S.S. Md-Sani, J. Md-Noor, W.H. Han, S.P. Gan, N.S. Rani, H.L. Tan, K. Rathakrishnan, A.S. MA, M. Abd-Rahman, Prediction of mortality in severe dengue cases. *BMC Infect Dis* **2018**, *18* (1), 232.
46. L.C. Katzelnick, C. Narvaez, S. Arguello, B. Lopez Mercado, D. Collado, O. Ampie, D. Elizondo, T. Miranda, F. Bustos Carillo, J.C. Mercado, K. Latta, A. Schiller, B. Segovia-Chumbez, S. Ojeda, N. Sanchez, M. Plazaola, J. Coloma, M.E. Halloran, L. Premkumar, A. Gordon, F. Narvaez, A.M. de Silva, G. Kuan, A. Balmaseda, E. Harris, Zika virus infection enhances future risk of severe dengue disease. *Science* **2020**, *369* (6507), 1123-1128.
47. J.A. Cardona-Ospina, V. Henao-SanMartin, W.F. Acevedo-Mendoza, K.M. Nasner-Posso, D.F. Martínez-Pulgarín, A. Restrepo-López, V. Valencia-Gallego, M.H. Collins, A.J. Rodríguez-Morales, Fatal Zika virus infection in the Americas: A systematic review. *Int J Infect Dis* **2019**, *88*, 49-59.
48. E. Marbán-Castro, A. Gonc , V. Fumadó, L. Romero-Acevedo, A. Bardají, Zika virus infection in pregnant women and their children: A review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **2021**, *265*, 162-168.
49. D.A. Freitas, R. Souza-Santos, L.M.A. Carvalho, W.B. Barros, L.M. Neves, P. Brasil, M.D. Wakimoto, Congenital Zika syndrome: A systematic review. *PLoS One* **2020**, *15* (12), e0242367.
50. N.G. Iglesias, A.V. Gamarnik, Dynamic RNA structures in the dengue virus genome. *RNA Biol* **2011**, *8* (2), 249-257.
51. S.S. Bradrick, Causes and Consequences of Flavivirus RNA Methylation. *Front Microbiol* **2017**, *8*, 2374.
52. C.T. Jones, L. Ma, J.W. Burgner, T.D. Groesch, C.B. Post, R.J. Kuhn, Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. *J Virol* **2003**, *77* (12), 7143-7149.
53. P. Scaturro, I.M. Trist, D. Paul, A. Kumar, E.G. Acosta, C.M. Byrd, R. Jordan, A. Brancale, R. Bartenschlager, Characterization of the mode of action of a potent dengue virus capsid inhibitor. *J Virol* **2014**, *88* (19), 11540-11555.
54. D. Sirohi, R.J. Kuhn, Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *J Infect Dis* **2017**, *216* (suppl_10), S935-s944.
55. V.A. Kostyuchenko, Q. Zhang, J.L. Tan, T.S. Ng, S.M. Lok, Immature and mature dengue serotype 1 virus structures provide insight into the maturation process. *J Virol* **2013**, *87* (13), 7700-7707.
56. I.M. Yu, W. Zhang, H.A. Holdaway, L. Li, V.A. Kostyuchenko, P.R. Chipman, R.J. Kuhn, M.G. Rossmann, J. Chen, Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science* **2008**, *319* (5871), 1834-1837.
57. V.M. Prasad, A.S. Miller, T. Klose, D. Sirohi, G. Buda, W. Jiang, R.J. Kuhn, M.G. Rossmann, Structure of the immature Zika virus at 9 Å resolution. *Nat Struct Mol Biol* **2017**, *24* (2), 184-186.
58. S. Mukhopadhyay, B.S. Kim, P.R. Chipman, M.G. Rossmann, R.J. Kuhn, Structure of West Nile virus. *Science* **2003**, *302* (5643), 248.
59. R.J. Kuhn, W. Zhang, M.G. Rossmann, S.V. Pletnev, J. Corver, E. Lenches, C.T. Jones, S. Mukhopadhyay, P.R. Chipman, E.G. Strauss, T.S. Baker, J.H. Strauss, Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* **2002**, *108* (5), 717-725.
60. T. Hu, Z. Wu, S. Wu, S. Chen, A. Cheng, The key amino acids of E protein involved in early flavivirus infection: viral entry. *Virology* **2021**, *18* (1), 136.
61. F.A. Rey, F.X. Heinz, C. Mandl, C. Kunz, S.C. Harrison, The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* **1995**, *375* (6529), 291-298.
62. T.C. Pierson, M.S. Diamond, The continued threat of emerging flaviviruses. *Nat Microbiol* **2020**, *5* (6), 796-812.
63. M. Perera-Lecoin, L. Meertens, X. Carnec, A. Amara, Flavivirus entry receptors: an update. *Viruses* **2013**, *6* (1), 69-88.
64. Y. Chen, T. Maguire, R.E. Hileman, J.R. Fromm, J.D. Esko, R.J. Linhardt, R.M. Marks, Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med* **1997**, *3* (8), 866-871.
65. B. Tassaneeritthep, T.H. Burgess, A. Granelli-Piperno, C. Trumpheller, J. Finke, W. Sun, M.A. Eller, K. Pattanapanyasat, S. Sarasombath, D.L. Birk, R.M. Steinman, S. Schlesinger, M.A. Marovich, DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* **2003**, *197* (7), 823-829.
66. J.L. Miller, B.J. de Wet, L. Martinez-Pomares, C.M. Radcliffe, R.A. Dwek, P.M. Rudd, S. Gordon, The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog* **2008**, *4* (2), e17.
67. L. Meertens, X. Carnec, M.P. Lecoin, R. Ramdasi, F. Guivel-Benhassine, E. Lew, G. Lemke, O. Schwartz, A. Amara, The TIM and TAM families of phosphatidyserine receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host Microbe* **2012**, *12* (4), 544-557.
68. C. Sabino, D. Bender, M.L. Herrlein, E. Hildt, The Epidermal Growth Factor Receptor Is a Relevant Host Factor in the Early Stages of The Zika Virus Life Cycle In Vitro. *J Virol* **2021**, *95* (20), e0119521.
69. C. Cruz-Oliveira, J.M. Freire, T.M. Conceição, L.M. Higa, M.A. Castanho, A.T. Da Poian, Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiol Rev* **2015**, *39* (2), 155-170.
70. A.T. Fishburn, O.H. Pham, M.W. Kenaston, N.S. Beesabathuni, P.S. Shah, Let's Get Physical: Flavivirus-Host Protein-Protein Interactions in Replication and Pathogenesis. *Front Microbiol* **2022**, *13*, 847588.
71. J.J. Chu, M.L. Ng, Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J Virol* **2004**, *78* (19), 10543-10555.
72. B.A. Hackett, S. Cherry, Flavivirus internalization is regulated by a size-dependent endocytic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2018**, *115* (16), 4246-4251.
73. L.H. Chao, D.E. Klein, A.G. Schmidt, J.M. Peña, S.C. Harrison, Sequential conformational rearrangements in flavivirus membrane fusion. *Elife* **2014**, *3*, e04389.
74. M. Li, D. Zhang, C. Li, Z. Zheng, M. Fu, F. Ni, Y. Liu, T. Du, H. Wang, G.E. Griffin, M. Zhang, Q. Hu, Characterization of Zika Virus Endocytic Pathways in Human Glioblastoma Cells. *Front Microbiol* **2020**, *11*, 242.
75. H.N. Ramanathan, S. Zhang, F. Douam, K.B. Mar, J. Chang, P.L. Yang, J.W. Schoggins, A. Ploss, B.D. Lindenbach, A Sensitive Yellow Fever Virus Entry Reporter Identifies Valosin-Containing Protein (VCP/p97) as an Essential Host Factor for Flavivirus Uncoating. *mBio* **2020**, *11* (2).
76. L.A. Byk, N.G. Iglesias, F.A. De Maio, L.G. Gebhard, M. Rossi, A.V. Gamarnik, Dengue Virus Genome Uncoating Requires Ubiquitination. *mBio* **2016**, *7* (3).
77. R. Assenberg, E. Mastrangelo, T.S. Walter, A. Verma, M. Milani, R.J. Owens, D.I. Stuart, J.M. Grimes, E.J. Mancini, Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. *J Virol* **2009**, *83* (24), 12895-12906.
78. S.M.A. B.M. K mmerer, C. M. Rice, Flavivirin. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Third Edition ed.; N.D. Rawlings, Ed. Elsevier: 2013; Vol. 3, pp 3112-3120.

79. T.E. Aktepe, J.M. Mackenzie, Shaping the flavivirus replication complex: It is curvaceous! *Cell Microbiol* **2018**, *20* (8), e12884.
80. L.G. Gebhard, C.V. Filomatori, A.V. Gamarnik, Functional RNA elements in the dengue virus genome. *Viruses* **2011**, *3* (9), 1739-1756.
81. L. Chatel-Chaix, R. Bartenschlager, Dengue virus- and hepatitis C virus-induced replication and assembly compartments: the enemy inside--caught in the web. *J Virol* **2014**, *88* (11), 5907-5911.
82. J.A. den Boon, P. Ahlquist, Organelle-like membrane compartmentalization of positive-strand RNA virus replication factories. *Annu Rev Microbiol* **2010**, *64*, 241-256.
83. S. Welsch, S. Miller, I. Romero-Brey, A. Merz, C.K. Bleck, P. Walther, S.D. Fuller, C. Antony, J. Krijnse-Locker, R. Bartenschlager, Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* **2009**, *5* (4), 365-375.
84. M. Cortese, S. Goellner, E.G. Acosta, C.J. Neufeldt, O. Oleksiuk, M. Lampe, U. Haselmann, C. Funaya, N. Schieber, P. Ronchi, M. Schorb, P. Pruunsild, Y. Schwab, L. Chatel-Chaix, A. Ruggieri, R. Bartenschlager, Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Rep* **2017**, *18* (9), 2113-2123.
85. K. van den Elsen, J.P. Quek, D. Luo, Molecular Insights into the Flavivirus Replication Complex. *Viruses* **2021**, *13* (6).
86. J. Lescar, S. Soh, L.T. Lee, S.G. Vasudevan, C. Kang, S.P. Lim, The Dengue Virus Replication Complex: From RNA Replication to Protein-Protein Interactions to Evasion of Innate Immunity. *Adv Exp Med Biol* **2018**, *1062*, 115-129.
87. P.Y. Shi, Structural biology. Unraveling a flavivirus enigma. *Science* **2014**, *343* (6173), 849-850.
88. T.Y. Tan, G. Fibriansah, V.A. Kostyuchenko, T.S. Ng, X.X. Lim, S. Zhang, X.N. Lim, J. Wang, J. Shi, M.C. Morais, D. Corti, S.M. Lok, Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. *Nat Commun* **2020**, *11* (1), 895.
89. T.X. Jordan, G. Randall, Flavivirus modulation of cellular metabolism. *Curr Opin Virol* **2016**, *19*, 7-10.
90. V.A. Villareal, M.A. Rodgers, D.A. Costello, P.L. Yang, Targeting host lipid synthesis and metabolism to inhibit dengue and hepatitis C viruses. *Antiviral Res* **2015**, *124*, 110-121.
91. P.S. Shah, N. Link, G.M. Jang, P.P. Sharp, T. Zhu, D.L. Swaney, J.R. Johnson, J. Von Dollen, H.R. Ramage, L. Satkamp, B. Newton, R. Hüttenhain, M.J. Petit, T. Baum, A. Everitt, O. Laufman, M. Tassetto, M. Shales, E. Stevenson, G.N. Iglesias, L. Shokat, S. Tripathi, V. Balasubramaniam, L.G. Webb, S. Aguirre, A.J. Willsey, A. Garcia-Sastre, K.S. Pollard, S. Cherry, A.V. Gamarnik, I. Marazzi, J. Taunton, A. Fernandez-Sesma, H.J. Bellen, R. Andino, N.J. Krogan, Comparative Flavivirus-Host Protein Interaction Mapping Reveals Mechanisms of Dengue and Zika Virus Pathogenesis. *Cell* **2018**, *175* (7), 1931-1945.e1918.
92. M. Renner, W. Dejnirattisai, L. Carrique, I.S. Martin, D. Karia, S.L. Ilca, S.F. Ho, A. Kotecha, J.R. Keown, J. Mongkolsapaya, G.R. Screaton, J.M. Grimes, Flavivirus maturation leads to the formation of an occupied lipid pocket in the surface glycoproteins. *Nat Commun* **2021**, *12* (1), 1238.
93. S.C. Araujo, L.R. Pereira, R.P.S. Alves, R. Andreata-Santos, A.I. Kanno, L.C.S. Ferreira, V.M. Gonçalves, Anti-Flavivirus Vaccines: Review of the Present Situation and Perspectives of Subunit Vaccines Produced in *Escherichia coli*. *Vaccines (Basel)* **2020**, *8* (3).
94. M. Kubinski, J. Beicht, T. Gerlach, A. Volz, G. Sutter, G.F. Rimmelzwaan, Tick-Borne Encephalitis Virus: A Quest for Better Vaccines against a Virus on the Rise. *Vaccines (Basel)* **2020**, *8* (3).
95. T. Ishikawa, A. Yamanaka, E. Konishi, A review of successful flavivirus vaccines and the problems with those flaviviruses for which vaccines are not yet available. *Vaccine* **2014**, *32* (12), 1326-1337.
96. S.Q. Deng, X. Yang, Y. Wei, J.T. Chen, X.J. Wang, H.J. Peng, A Review on Dengue Vaccine Development. *Vaccines (Basel)* **2020**, *8* (1).
97. A. Pattnaik, B.R. Sahoo, A.K. Pattnaik, Current Status of Zika Virus Vaccines: Successes and Challenges. *Vaccines (Basel)* **2020**, *8* (2).
98. M.J. Pérez-Pérez, J.C. Saiz, E.M. Priego, M.A. Martín-Acebes, Antivirals against (Re)emerging Flaviviruses: Should We Target the Virus or the Host? *ACS Med Chem Lett* **2022**, *13* (1), 5-10.
99. Y.S. Tian, Y. Zhou, T. Takagi, M. Kameoka, N. Kawashita, Dengue Virus and Its Inhibitors: A Brief Review. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2018**, *66* (3), 191-206.
100. S.K. Samrat, J. Xu, Z. Li, J. Zhou, H. Li, Antiviral Agents against Flavivirus Protease: Prospect and Future Direction. *Pathogens* **2022**, *11* (3).
101. S.P. Lim, C.G. Noble, P.Y. Shi, The dengue virus NS5 protein as a target for drug discovery. *Antiviral Res* **2015**, *119*, 57-67.
102. Z. Lv, Y. Chu, Y. Wang, HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. *HIV AIDS (Auckl)* **2015**, *7*, 95-104.
103. T. Kish, A. Aziz, M. Sorio, Hepatitis C in a New Era: A Review of Current Therapies. *P t* **2017**, *42* (5), 316-329.
104. S.J.F. Kaptein, O. Goethals, D. Kiemel, A. Marchand, B. Kesteley, J.F. Bonfanti, D. Bardiot, B. Stoops, T.H.M. Jonckers, K. Dallmeier, P. Gelyukens, K. Thys, M. Crabbe, L. Chatel-Chaix, M. Münster, G. Querat, F. Touret, X. de Lamballerie, P. Raboisson, K. Simmen, P. Chaltin, R. Bartenschlager, M. Van Loock, J. Neyts, A pan-serotype dengue virus inhibitor targeting the NS3-NS4B interaction. *Nature* **2021**, *598* (7881), 504-509.
105. V.A. Golubeva, T.C. Nepomuceno, G. Gregoriis, R.D. Mesquita, X. Li, S. Dash, P.P. Garcez, G. Suarez-Kurtz, V. Izumi, J. Koomen, M.A. Carvalho, A.N.A. Monteiro, Network of Interactions between ZIKA Virus Non-Structural Proteins and Human Host Proteins. *Cells* **2020**, *9* (1).
106. N.G. Seidah, A. Pasquato, U. Andréo, How Do Enveloped Viruses Exploit the Secretory Proprotein Convertases to Regulate Infectivity and Spread? *Viruses* **2021**, *13* (7).
107. S. Wichit, N. Gumpangseth, R. Hamel, S. Yainoy, S. Arikit, C. Punsawad, D. Missé, Chikungunya and Zika Viruses: Co-Circulation and the Interplay between Viral Proteins and Host Factors. *Pathogens* **2021**, *10* (4).
108. E.E.A. Osman, A. Rehemtulla, N. Neamati, Why All the Fury over Furin? *J Med Chem* **2022**, *65* (4), 2747-2784.
109. A.K. Bera, R.J. Kuhn, J.L. Smith, Functional characterization of cis and trans activity of the Flavivirus NS2B-NS3 protease. *J Biol Chem* **2007**, *282* (17), 12883-12892.
110. W. Rut, L. Zhang, P. Kasperkiewicz, M. Poreba, R. Hilgenfeld, M. Drag, Extended substrate specificity and first potent irreversible inhibitor/activity-based probe design for Zika virus NS2B-NS3 protease. *Antiviral Res* **2017**, *139*, 88-94.
111. R. Grantham, Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* **1974**, *185* (4154), 862-864.
112. N.A. Patil, J.P. Quek, B. Schroeder, R. Morewood, J. Rademann, D. Luo, C. Nitsche, 2-Cyanoisonicotinamide Conjugation: A Facile Approach to Generate Potent Peptide Inhibitors of the Zika Virus Protease. *ACS Med Chem Lett* **2021**, *12* (5), 732-737.
113. K.J. Chappell, M.J. Stoermer, D.P. Fairlie, P.R. Young, Insights to substrate binding and processing by West Nile Virus NS3 protease through combined modeling, protease mutagenesis, and kinetic studies. *J Biol Chem* **2006**, *281* (50), 38448-38458.
114. J.E. Knox, N.L. Ma, Z. Yin, S.J. Patel, W.L. Wang, W.L. Chan, K.R. Ranga Rao, G. Wang, X. Ngew, V. Patel, D. Beer, S.P. Lim, S.G. Vasudevan, T.H. Keller, Peptide inhibitors of West Nile NS3 protease: SAR study of tetrapeptide aldehyde inhibitors. *J Med Chem* **2006**, *49* (22), 6585-6590.
115. A.E. Aleshin, S.A. Shiryaev, A.Y. Strongin, R.C. Liddington, Structural evidence for regulation and specificity of flaviviral proteases and evolution of the Flaviviridae fold. *Protein Sci* **2007**, *16* (5), 795-806.
116. J. Lei, G. Hansen, C. Nitsche, C.D. Klein, L. Zhang, R. Hilgenfeld, Crystal structure of Zika virus NS2B-NS3 protease in complex with a boronate inhibitor. *Science* **2016**, *353* (6298), 503-505.

117. D. Leung, K. Schroder, H. White, N.X. Fang, M.J. Stoermer, G. Abbenante, J.L. Martin, P.R. Young, D.P. Fairlie, Activity of recombinant dengue 2 virus NS3 protease in the presence of a truncated NS2B co-factor, small peptide substrates, and inhibitors. *J Biol Chem* **2001**, *276* (49), 45762-45771.
118. T.A. Nall, K.J. Chappell, M.J. Stoermer, N.X. Fang, J.D. Tyndall, P.R. Young, D.P. Fairlie, Enzymatic characterization and homology model of a catalytically active recombinant West Nile virus NS3 protease. *J Biol Chem* **2004**, *279* (47), 48535-48542.
119. J. Li, S.P. Lim, D. Beer, V. Patel, D. Wen, C. Tumanut, D.C. Tully, J.A. Williams, J. Jiricek, J.P. Priestle, J.L. Harris, S.G. Vasudevan, Functional profiling of recombinant NS3 proteases from all four serotypes of dengue virus using tetrapeptide and octapeptide substrate libraries. *J Biol Chem* **2005**, *280* (31), 28766-28774.
120. Y.M. Kim, S. Gayen, C. Kang, J. Joy, Q. Huang, A.S. Chen, J.L. Wee, M.J. Ang, H.A. Lim, A.W. Hung, R. Li, C.G. Noble, T. Lee le, A. Yip, Q.Y. Wang, C.S. Chia, J. Hill, P.Y. Shi, T.H. Keller, NMR analysis of a novel enzymatically active unlinked dengue NS2B-NS3 protease complex. *J Biol Chem* **2013**, *288* (18), 12891-12900.
121. Z. Zhang, Y. Li, Y.R. Loh, W.W. Phoo, A.W. Hung, C. Kang, D. Luo, Crystal structure of unlinked NS2B-NS3 protease from Zika virus. *Science* **2016**, *354* (6319), 1597-1600.
122. N.J. Braun, J.P. Quek, S. Huber, J. Kouretova, D. Rogge, H. Lang-Henkel, E.Z.K. Cheong, B.L.A. Chew, A. Heine, D. Luo, T. Steinmetzer, Structure-Based Macrocyclization of Substrate Analogue NS2B-NS3 Protease Inhibitors of Zika, West Nile and Dengue viruses. *ChemMedChem* **2020**, *15* (15), 1439-1452.
123. L. de la Cruz, W.N. Chen, B. Graham, G. Otting, Binding mode of the activity-modulating C-terminal segment of NS2B to NS3 in the dengue virus NS2B-NS3 protease. *Febs J* **2014**, *281* (6), 1517-1533.
124. W.W. Phoo, Y. Li, Z. Zhang, M.Y. Lee, Y.R. Loh, Y.B. Tan, E.Y. Ng, J. Lescar, C. Kang, D. Luo, Structure of the NS2B-NS3 protease from Zika virus after self-cleavage. *Nat Commun* **2016**, *7*, 13410.
125. D. Luo, T. Xu, C. Hunke, G. Grüber, S.G. Vasudevan, J. Lescar, Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus. *J Virol* **2008**, *82* (1), 173-183.
126. W.W. Phoo, A. El Sahili, Z. Zhang, M.W. Chen, C.W. Liew, J. Lescar, S.G. Vasudevan, D. Luo, Crystal structures of full length DENV4 NS2B-NS3 reveal the dynamic interaction between NS2B and NS3. *Antiviral Res* **2020**, *182*, 104900.
127. C. Nitsche, Proteases from dengue, West Nile and Zika viruses as drug targets. *Biophys Rev* **2019**, *11* (2), 157-165.
128. X. Chen, K. Yang, C. Wu, C. Chen, C. Hu, O. Buzovetsky, Z. Wang, X. Ji, Y. Xiong, H. Yang, Mechanisms of activation and inhibition of Zika virus NS2B-NS3 protease. *Cell Res* **2016**, *26* (11), 1260-1263.
129. L. de la Cruz, T.H. Nguyen, K. Ozawa, J. Shin, B. Graham, T. Huber, G. Otting, Binding of low molecular weight inhibitors promotes large conformational changes in the dengue virus NS2B-NS3 protease: fold analysis by pseudocontact shifts. *J Am Chem Soc* **2011**, *133* (47), 19205-19215.
130. X.C. Su, K. Ozawa, R. Qi, S.G. Vasudevan, S.P. Lim, G. Otting, NMR analysis of the dynamic exchange of the NS2B cofactor between open and closed conformations of the West Nile virus NS2B-NS3 protease. *PLoS Negl Trop Dis* **2009**, *3* (12), e561.
131. Y. Li, Z. Zhang, W.W. Phoo, Y.R. Loh, R. Li, H.Y. Yang, A.E. Jansson, J. Hill, T.H. Keller, K. Nacro, D. Luo, C. Kang, Structural Insights into the Inhibition of Zika Virus NS2B-NS3 Protease by a Small-Molecule Inhibitor. *Structure* **2018**, *26* (4), 555-564.e553.
132. M. Goldflam, C.G. Ullman, Recent Advances Toward the Discovery of Drug-Like Peptides De novo. *Front Chem* **2015**, *3*, 69.
133. S. Chanprapaph, P. Saparpakorn, C. Sangma, P. Niyomrattanakit, S. Hannongbua, C. Angsuthanasombat, G. Katzenmeier, Competitive inhibition of the dengue virus NS3 serine protease by synthetic peptides representing polyprotein cleavage sites. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, *330* (4), 1237-1246.
134. Z. Yin, S.J. Patel, W.L. Wang, G. Wang, W.L. Chan, K.R. Rao, J. Alam, D.A. Jeyaraj, X. Ngew, V. Patel, D. Beer, S.P. Lim, S.G. Vasudevan, T.H. Keller, Peptide inhibitors of Dengue virus NS3 protease. Part 1: Warhead. *Bioorg Med Chem Lett* **2006**, *16* (1), 36-39.
135. Z. Yin, S.J. Patel, W.L. Wang, W.L. Chan, K.R. Ranga Rao, G. Wang, X. Ngew, V. Patel, D. Beer, J.E. Knox, N.L. Ma, C. Ehrhardt, S.P. Lim, S.G. Vasudevan, T.H. Keller, Peptide inhibitors of dengue virus NS3 protease. Part 2: SAR study of tetrapeptide aldehyde inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2006**, *16* (1), 40-43.
136. K. Löhr, J.E. Knox, W.Y. Phong, N.L. Ma, Z. Yin, A. Sampath, S.J. Patel, W.L. Wang, W.L. Chan, K.R.R. Rao, G. Wang, S.G. Vasudevan, T.H. Keller, S.P. Lim, Yellow fever virus NS3 protease: peptide-inhibition studies. *J Gen Virol* **2007**, *88* (Pt 8), 2223-2227.
137. Y. Li, Z. Zhang, W.W. Phoo, Y.R. Loh, W. Wang, S. Liu, M.W. Chen, A.W. Hung, T.H. Keller, D. Luo, C. Kang, Structural Dynamics of Zika Virus NS2B-NS3 Protease Binding to Dipeptide Inhibitors. *Structure* **2017**, *25* (8), 1242-1250.e1243.
138. C. Kang, S. Gayen, W. Wang, R. Severin, A.S. Chen, H.A. Lim, C.S. Chia, A. Schüller, D.N. Doan, A. Poulsen, J. Hill, S.G. Vasudevan, T.H. Keller, Exploring the binding of peptidic West Nile virus NS2B-NS3 protease inhibitors by NMR. *Antiviral Res* **2013**, *97* (2), 137-144.
139. C. Nitsche, L. Zhang, L.F. Weigel, J. Schilz, D. Graf, R. Bartenschlager, R. Hilgenfeld, C.D. Klein, Peptide-Boronic Acid Inhibitors of Flaviviral Proteases: Medicinal Chemistry and Structural Biology. *J Med Chem* **2017**, *60* (1), 511-516.
140. M. Skoreński, A. Milewska, K. Pyrc, M. Sieńczyk, J. Oleksyszyn, Phosphonate inhibitors of West Nile virus NS2B/NS3 protease. *J Enzyme Inhib Med Chem* **2019**, *34* (1), 8-14.
141. M.J. Stoermer, K.J. Chappell, S. Liebscher, C.M. Jensen, C.H. Gan, P.K. Gupta, W.J. Xu, P.R. Young, D.P. Fairlie, Potent cationic inhibitors of West Nile virus NS2B/NS3 protease with serum stability, cell permeability and antiviral activity. *J Med Chem* **2008**, *51* (18), 5714-5721.
142. H.A. Lim, J. Joy, J. Hill, C. San Brian Chia, Novel agmatine and agmatine-like peptidomimetic inhibitors of the West Nile virus NS2B/NS3 serine protease. *Eur J Med Chem* **2011**, *46* (7), 3130-3134.
143. H.A. Lim, M.J. Ang, J. Joy, A. Poulsen, W. Wu, S.C. Ching, J. Hill, C.S. Chia, Novel agmatine dipeptide inhibitors against the West Nile virus NS2B/NS3 protease: a P3 and N-cap optimization study. *Eur J Med Chem* **2013**, *62*, 199-205.
144. M.Z. Hammamy, C. Haase, M. Hammami, R. Hilgenfeld, T. Steinmetzer, Development and characterization of new peptidomimetic inhibitors of the West Nile virus NS2B-NS3 protease. *ChemMedChem* **2013**, *8* (2), 231-241.
145. B. Schroeder, P. Demirel, C. Fischer, E. Masri, S. Kallis, L. Redl, T. Rudolf, S. Bergemann, C. Arkona, C. Nitsche, R. Bartenschlager, J. Rademann, Nanoparticle Inhibitors of Flavivirus Proteases from Zika, West Nile and Dengue Virus Are Cell-Permeable Antivirals. *ACS Med Chem Lett* **2021**, *12* (12), 1955-1961.
146. S. Colarusso, F. Ferrigno, S. Ponzi, F. Pavone, I. Conte, L. Abate, E. Beghetto, A. Missineo, J. Amaudrut, A. Bresciani, G. Paonessa, L. Tomei, C. Montalbetti, E. Bianchi, C. Toniatti, J.M. Ontoria, SAR evolution towards potent C-terminal carboxamide peptide inhibitors of Zika virus NS2B-NS3 protease. *Bioorg Med Chem* **2022**, *57*, 116631.
147. J. Kouretova, M.Z. Hammamy, A. Epp, K. Harges, S. Kallis, L. Zhang, R. Hilgenfeld, R. Bartenschlager, T. Steinmetzer, Effects of NS2B-NS3 protease and furin inhibition on West Nile and Dengue virus replication. *J Enzyme Inhib Med Chem* **2017**, *32* (1), 712-721.
148. W.W. Phoo, Z. Zhang, M. Wirawan, E.J.C. Chew, A.B.L. Chew, J. Kouretova, T. Steinmetzer, D. Luo, Structures of Zika virus NS2B-NS3 protease in complex with peptidomimetic inhibitors. *Antiviral Res* **2018**, *160*, 17-24.

149. P. Prusis, M. Junaid, R. Petrovska, S. Yahorava, A. Yahorau, G. Katzenmeier, M. Lapins, J.E. Wikberg, Design and evaluation of substrate-based octapeptide and non substrate-based tetrapeptide inhibitors of dengue virus NS2B-NS3 proteases. *Biochem Biophys Res Commun* **2013**, *434* (4), 767-772.
150. G.C. Zhou, Z. Weng, X. Shao, F. Liu, X. Nie, J. Liu, D. Wang, C. Wang, K. Guo, Discovery and SAR studies of methionine-proline anilides as dengue virus NS2B-NS3 protease inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2013**, *23* (24), 6549-6554.
151. Z. Weng, X. Shao, D. Graf, C. Wang, C.D. Klein, J. Wang, G.C. Zhou, Identification of fused bicyclic derivatives of pyrrolidine and imidazolidinone as dengue virus-2 NS2B-NS3 protease inhibitors. *Eur J Med Chem* **2017**, *125*, 751-759.
152. C. Nitsche, M.A. Behnam, C. Steuer, C.D. Klein, Retro peptide-hybrids as selective inhibitors of the Dengue virus NS2B-NS3 protease. *Antiviral Res* **2012**, *94* (1), 72-79.
153. C. Nitsche, V.N. Schreier, M.A. Behnam, A. Kumar, R. Bartenschlager, C.D. Klein, Thiazolidinone-peptide hybrids as dengue virus protease inhibitors with antiviral activity in cell culture. *J Med Chem* **2013**, *56* (21), 8389-8403.
154. M.A. Behnam, C. Nitsche, S.M. Vecchi, C.D. Klein, C-terminal residue optimization and fragment merging: discovery of a potent Peptide-hybrid inhibitor of dengue protease. *ACS Med Chem Lett* **2014**, *5* (9), 1037-1042.
155. L.F. Weigel, C. Nitsche, D. Graf, R. Bartenschlager, C.D. Klein, Phenylalanine and Phenylglycine Analogues as Arginine Mimetics in Dengue Protease Inhibitors. *J Med Chem* **2015**, *58* (19), 7719-7733.
156. M.A. Behnam, D. Graf, R. Bartenschlager, D.P. Zlotos, C.D. Klein, Discovery of Nanomolar Dengue and West Nile Virus Protease Inhibitors Containing a 4-Benzyloxyphenylglycine Residue. *J Med Chem* **2015**, *58* (23), 9354-9370.
157. T. Dražić, S. Kopf, J. Corridan, M.M. Leuthold, B. Bertoša, C.D. Klein, Peptide- β -lactam Inhibitors of Dengue and West Nile Virus NS2B-NS3 Protease Display Two Distinct Binding Modes. *J Med Chem* **2020**, *63* (1), 140-156.
158. N. Kühn, D. Graf, J. Bock, M.A.M. Behnam, M.M. Leuthold, C.D. Klein, A New Class of Dengue and West Nile Virus Protease Inhibitors with Submicromolar Activity in Reporter Gene DENV-2 Protease and Viral Replication Assays. *J Med Chem* **2020**, *63* (15), 8179-8197.
159. N. Kühn, M.M. Leuthold, M.A.M. Behnam, C.D. Klein, Beyond Basicity: Discovery of Nonbasic DENV-2 Protease Inhibitors with Potent Activity in Cell Culture. *J Med Chem* **2021**, *64* (8), 4567-4587.
160. N.H. Mueller, C. Yon, V.K. Ganesh, R. Padmanabhan, Characterization of the West Nile virus protease substrate specificity and inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* **2007**, *39* (3), 606-614.
161. L. Cregar-Hernandez, G.S. Jiao, A.T. Johnson, A.T. Lehrer, T.A. Wong, S.A. Margosiak, Small molecule pan-dengue and West Nile virus NS3 protease inhibitors. *Antivir Chem Chemother* **2011**, *21* (5), 209-217.
162. H.A. Rothan, A.Y. Abdulrahman, P.G. Sasikumer, S. Othman, N.A. Rahman, R. Yusof, Protegrin-1 inhibits dengue NS2B-NS3 serine protease and viral replication in MK2 cells. *J Biomed Biotechnol* **2012**, *2012*, 251482.
163. S. Xu, H. Li, X. Shao, C. Fan, B. Ericksen, J. Liu, C. Chi, C. Wang, Critical effect of peptide cyclization on the potency of peptide inhibitors against Dengue virus NS2B-NS3 protease. *J Med Chem* **2012**, *55* (15), 6881-6887.
164. J.J. Chu, R.C. Lee, M.J. Ang, W.L. Wang, H.A. Lim, J.L. Wee, J. Joy, J. Hill, C.S. Brian Chia, Antiviral activities of 15 dengue NS2B-NS3 protease inhibitors using a human cell-based viral quantification assay. *Antiviral Res* **2015**, *118*, 68-74.
165. Y. Takagi, K. Matsui, H. Nobori, H. Maeda, A. Sato, T. Kurosu, Y. Orba, H. Sawa, K. Hattori, K. Higashino, Y. Numata, Y. Yoshida, Discovery of novel cyclic peptide inhibitors of dengue virus NS2B-NS3 protease with antiviral activity. *Bioorg Med Chem Lett* **2017**, *27* (15), 3586-3590.
166. A.M. Pinkham, Z. Yu, J.A. Cowan, Attenuation of West Nile Virus NS2B/NS3 Protease by Amino Terminal Copper and Nickel Binding (ATCUN) Peptides. *J Med Chem* **2018**, *61* (3), 980-988.
167. A.M. Pinkham, Z. Yu, J.A. Cowan, Broad-spectrum catalytic metalloprotease inactivators of Zika and West Nile virus NS2B/NS3 proteases. *Chem Commun (Camb)* **2018**, *54* (87), 12357-12360.
168. S. Voss, J. Rademann, C. Nitsche, Peptide-Bismuth Bicycles: In Situ Access to Stable Constrained Peptides with Superior Bioactivity. *Angew Chem Int Ed Engl* **2022**, *61* (4), e202113857.
169. J.L. Lau, M.K. Dunn, Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorg Med Chem* **2018**, *26* (10), 2700-2707.
170. L. Wang, N. Wang, W. Zhang, X. Cheng, Z. Yan, G. Shao, X. Wang, R. Wang, C. Fu, Therapeutic peptides: current applications and future directions. *Signal Transduct Target Ther* **2022**, *7* (1), 48.
171. L. Atangcho, T. Navaratna, G.M. Thurber, Hitting Undruggable Targets: Viewing Stabilized Peptide Development through the Lens of Quantitative Systems Pharmacology. *Trends Biochem Sci* **2019**, *44* (3), 241-257.
172. S.S. Cheng, G.J. Yang, W. Wang, C.H. Leung, D.L. Ma, The design and development of covalent protein-protein interaction inhibitors for cancer treatment. *J Hematol Oncol* **2020**, *13* (1), 26.
173. N.J. Yang, M.J. Hinner, Getting across the cell membrane: an overview for small molecules, peptides, and proteins. *Methods Mol Biol* **2015**, *1266*, 29-53.
174. T.H. Keller, Y.L. Chen, J.E. Knox, S.P. Lim, N.L. Ma, S.J. Patel, A. Sampath, Q.Y. Wang, Z. Yin, S.G. Vasudevan, Finding new medicines for flaviviral targets. *Novartis Found Symp* **2006**, *277*, 102-114; discussion 114-109, 251-103.
175. K.H. Lin, A. Ali, L. Ruserer, D.I. Soumana, N. Kurt Yilmaz, C.A. Schiffer, Dengue Virus NS2B/NS3 Protease Inhibitors Exploiting the Prime Side. *J Virol* **2017**, *91* (10), 176.
176. Z. Qian, T. Liu, Y.Y. Liu, R. Briesewitz, A.M. Barrios, S.M. Jhiang, D. Pei, Efficient delivery of cyclic peptides into mammalian cells with short sequence motifs. *ACS Chem Biol* **2013**, *8* (2), 423-431.
177. Z. Qian, J.R. LaRochelle, B. Jiang, W. Lian, R.L. Hard, N.G. Selner, R. Luechapanichkul, A.M. Barrios, D. Pei, Early endosomal escape of a cyclic cell-penetrating peptide allows effective cytosolic cargo delivery. *Biochemistry* **2014**, *53* (24), 4034-4046.
178. C.G. Noble, C.C. Seh, A.T. Chao, P.Y. Shi, Ligand-bound structures of the dengue virus protease reveal the active conformation. *J Virol* **2012**, *86* (1), 438-446.
179. P. Erbel, N. Schiering, A. D'Arcy, M. Renatus, M. Kroemer, S.P. Lim, Z. Yin, T.H. Keller, S.G. Vasudevan, U. Hommel, Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. *Nat Struct Mol Biol* **2006**, *13* (4), 372-373.
180. G. Robin, K. Chappell, M.J. Stoermer, S.H. Hu, P.R. Young, D.P. Fairlie, J.L. Martin, Structure of West Nile virus NS3 protease: ligand stabilization of the catalytic conformation. *J Mol Biol* **2009**, *385* (5), 1568-1577.
181. S. Yuan, J.F. Chan, H. den-Haan, K.K. Chik, A.J. Zhang, C.C. Chan, V.K. Poon, C.C. Yip, W.W. Mak, Z. Zhu, Z. Zou, K.M. Tee, J.P. Cai, K.H. Chan, J. de la Peña, H. Pérez-Sánchez, J.P. Cerón-Carrasco, K.Y. Yuen, Structure-based discovery of clinically approved drugs as Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitors that potently inhibit Zika virus infection in vitro and in vivo. *Antiviral Res* **2017**, *145*, 33-43.
182. N. Pathak, Y.P. Kuo, T.Y. Chang, C.T. Huang, H.C. Hung, J.T. Hsu, G.Y. Yu, J.M. Yang, Zika Virus NS3 Protease Pharmacophore Anchor Model and Drug Discovery. *Sci Rep* **2020**, *10* (1), 8929.
183. A. Balasubramanian, M. Manzano, T. Teramoto, R. Pilankatta, R. Padmanabhan, High-throughput screening for the identification of small-molecule inhibitors of the flaviviral protease. *Antiviral Res* **2016**, *134*, 6-16.
184. G. Rassias, V. Zogali, C.M.D. Swarbrick, K.W. Ki Chan, S.A. Chan, C.P. Gwee, S. Wang, E. Kaplanai, A. Canko, D. Kioussis, J. Lescar, D. Luo, M.T. Matsoukas, S.G. Vasudevan, Cell-active carbazole derivatives as inhibitors of the Zika virus protease. *Eur J Med Chem* **2019**, *180*, 536-545.

185. C. Steuer, C. Gege, W. Fischl, K.H. Heinonen, R. Bartenschlager, C.D. Klein, Synthesis and biological evaluation of α -ketoamides as inhibitors of the Dengue virus protease with antiviral activity in cell-culture. *Bioorg Med Chem* **2011**, *19* (13), 4067-4074.
186. C. Nitsche, C. Steuer, C.D. Klein, Arylcyanocrylamides as inhibitors of the Dengue and West Nile virus proteases. *Bioorg Med Chem* **2011**, *19* (24), 7318-7337.
187. H. Liu, R. Wu, Y. Sun, Y. Ye, J. Chen, X. Luo, X. Shen, H. Liu, Identification of novel thiadiazoloacrylamide analogues as inhibitors of dengue-2 virus NS2B/NS3 protease. *Bioorg Med Chem* **2014**, *22* (22), 6344-6352.
188. N.H. Mueller, N. Pattabiraman, C. Ansarah-Sobrinho, P. Viswanathan, T.C. Pierson, R. Padmanabhan, Identification and biochemical characterization of small-molecule inhibitors of west Nile virus serine protease by a high-throughput screen. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**, *52* (9), 3385-3393.
189. S.A. Shiryaev, A.V. Cheltsov, K. Gawlik, B.I. Ratnikov, A.Y. Strongin, Virtual ligand screening of the National Cancer Institute (NCI) compound library leads to the allosteric inhibitory scaffolds of the West Nile Virus NS3 proteinase. *Assay Drug Dev Technol* **2011**, *9* (1), 69-78.
190. S. Sidique, S.A. Shiryaev, B.I. Ratnikov, A. Herath, Y. Su, A.Y. Strongin, N.D. Cosford, Structure-activity relationship and improved hydrolytic stability of pyrazole derivatives that are allosteric inhibitors of West Nile Virus NS2B-NS3 proteinase. *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19* (19), 5773-5777.
191. X. Koh-Stenta, J. Joy, S.F. Wang, P.Z. Kwek, J.L. Wee, K.F. Wan, S. Gayen, A.S. Chen, C. Kang, M.A. Lee, A. Poulsen, S.G. Vasudevan, J. Hill, K. Nacro, Identification of covalent active site inhibitors of dengue virus protease. *Drug Des Devel Ther* **2015**, *9*, 6389-6399.
192. N. Pathak, M.L. Lai, W.Y. Chen, B.W. Hsieh, G.Y. Yu, J.M. Yang, Pharmacophore anchor models of flaviviral NS3 proteases lead to drug repurposing for DENV infection. *BMC Bioinformatics* **2017**, *18* (Suppl 16), 548.
193. M. Brecher, Z. Li, B. Liu, J. Zhang, C.A. Koetzner, A. Alifarag, S.A. Jones, Q. Lin, L.D. Kramer, H. Li, A conformational switch high-throughput screening assay and allosteric inhibition of the flavivirus NS2B-NS3 protease. *PLoS Pathog* **2017**, *13* (5), e1006411.
194. B. Millies, F. von Hammerstein, A. Gellert, S. Hammerschmidt, F. Barthels, U. Göppel, M. Immerheiser, F. Elgner, N. Jung, M. Basic, C. Kersten, W. Kiefer, J. Bodem, E. Hildt, M. Windbergs, U.A. Hellmich, T. Schirmeister, Proline-Based Allosteric Inhibitors of Zika and Dengue Virus NS2B/NS3 Proteases. *J Med Chem* **2019**, *62* (24), 11359-11382.
195. H. Wu, S. Bock, M. Snitko, T. Berger, T. Weidner, S. Holloway, M. Kanitz, W.E. Diederich, H. Steuber, C. Walter, D. Hofmann, B. Weißbrich, R. Spannaus, E.G. Acosta, R. Bartenschlager, B. Engels, T. Schirmeister, J. Bodem, Novel dengue virus NS2B/NS3 protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **2015**, *59* (2), 1100-1109.
196. Y. Yao, T. Huo, Y.L. Lin, S. Nie, F. Wu, Y. Hua, J. Wu, A.R. Kneubehl, M.B. Vogt, R. Rico-Hesse, Y. Song, Discovery, X-ray Crystallography and Antiviral Activity of Allosteric Inhibitors of Flavivirus NS2B-NS3 Protease. *J Am Chem Soc* **2019**, *141* (17), 6832-6836.
197. S. Nie, Y. Yao, F. Wu, X. Wu, J. Zhao, Y. Hua, J. Wu, T. Huo, Y.L. Lin, A.R. Kneubehl, M.B. Vogt, J. Ferreón, R. Rico-Hesse, Y. Song, Synthesis, Structure-Activity Relationships, and Antiviral Activity of Allosteric Inhibitors of Flavivirus NS2B-NS3 Protease. *J Med Chem* **2021**, *64* (5), 2777-2800.
198. S. Nie, J. Zhao, X. Wu, Y. Yao, F. Wu, Y.L. Lin, X. Li, A.R. Kneubehl, M.B. Vogt, R. Rico-Hesse, Y. Song, Synthesis, structure-activity relationship and antiviral activity of indole-containing inhibitors of Flavivirus NS2B-NS3 protease. *Eur J Med Chem* **2021**, *225*, 113767.
199. S. Pambudi, N. Kawashita, S. Phanthanawiboon, M.D. Omokoko, P. Masrinoul, A. Yamashita, K. Limkittikul, T. Yasunaga, T. Takagi, K. Ikuta, T. Kuroso, A small compound targeting the interaction between nonstructural proteins 2B and 3 inhibits dengue virus replication. *Biochem Biophys Res Commun* **2013**, *440* (3), 393-398.
200. Z. Li, M. Brecher, Y.Q. Deng, J. Zhang, S. Sakamuru, B. Liu, R. Huang, C.A. Koetzner, C.A. Allen, S.A. Jones, H. Chen, N.N. Zhang, M. Tian, F. Gao, Q. Lin, N. Banavali, J. Zhou, N. Boles, M. Xia, L.D. Kramer, C.F. Qin, H. Li, Existing drugs as broad-spectrum and potent inhibitors for Zika virus by targeting NS2B-NS3 interaction. *Cell Res* **2017**, *27* (8), 1046-1064.
201. Z. Li, S. Sakamuru, R. Huang, M. Brecher, C.A. Koetzner, J. Zhang, H. Chen, C.F. Qin, Q.Y. Zhang, J. Zhou, L.D. Kramer, M. Xia, H. Li, Erythrosin B is a potent and broad-spectrum orthosteric inhibitor of the flavivirus NS2B-NS3 protease. *Antiviral Res* **2018**, *150*, 217-225.
202. C. Nitsche, T. Passioura, P. Varava, M.C. Mahawaththa, M.M. Leuthold, C.D. Klein, H. Suga, G. Otting, De Novo Discovery of Nonstandard Macrocyclic Peptides as Noncompetitive Inhibitors of the Zika Virus NS2B-NS3 Protease. *ACS Med Chem Lett* **2019**, *10* (2), 168-174.
203. R. Grinter, Questionable Ligand Density: 6MO0, 6MO1, 6MO2. zu finden unter <https://www.mail-archive.com/ccp4bb@jiscmail.ac.uk/msg47072.html> **2019**, *19* (2019), 6.
204. T.J. Green, Questionable Ligand Density: 6MO0, 6MO1, 6MO2. zu finden unter <https://www.mail-archive.com/ccp4bb@jiscmail.ac.uk/msg47086.html> **2019**, *29* (2019), 16.
205. M.Z. Hammamy, Development and characterization of new peptidomimetic inhibitors of the West Nile virus NS2B-NS3 protease. Dissertation, Philipps-Universität Marburg, 2014.
206. S. Huber, N.J. Braun, L.C. Schmacke, J.P. Quek, R. Murra, D. Bender, E. Hildt, D. Luo, A. Heine, T. Steinmetzer, Structure-Based Optimization and Characterization of Macrocyclic Zika Virus NS2B-NS3 Protease Inhibitors. *J Med Chem* **2022**, *65* (9), 6555-6572.
207. L.C. Schmacke, Synthese und Charakterisierung neuer cyclischer Flavivirininhibitoren. Masterarbeit, Philipps-Universität Marburg, 2021.
208. M. Dixon, The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J* **1953**, *55* (1), 170-171.
209. S. Voss, C. Nitsche, Inhibitors of the Zika virus protease NS2B-NS3. *Bioorg Med Chem Lett* **2020**, *30* (5), 126965.
210. K. Lee, W.H. Jung, C.W. Park, C.Y. Hong, I.C. Kim, S. Kim, Y.S. Oh, O.H. Kwon, S.H. Lee, H.D. Park, S.W. Kim, Y.H. Lee, Y.J. Yoo, Benzylamine-based selective and orally bioavailable inhibitors of thrombin. *Bioorg Med Chem Lett* **1998**, *8* (18), 2563-2568.
211. D.J. Pinto, M.J. Orwat, S. Koch, K.A. Rossi, R.S. Alexander, A. Smallwood, P.C. Wong, A.R. Rendina, J.M. Luetzgen, R.M. Knabb, K. He, B. Xin, R.R. Wexler, P.Y. Lam, Discovery of 1-(4-methoxyphenyl)-7-oxo-6-(4-(2-oxopiperidin-1-yl)phenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-pyrazolo[3,4-c]pyridine-3-carboxamide (apixaban, BMS-562247), a highly potent, selective, efficacious, and orally bioavailable inhibitor of blood coagulation factor Xa. *J Med Chem* **2007**, *50* (22), 5339-5356.
212. A. Lee, Berotralstat: First Approval. *Drugs* **2021**, *81* (3), 405-409.
213. R. Copeland, Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery, 2005. Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
214. C. Neale, H. Ghanei, J. Holyoake, R.E. Bishop, G.G. Privé, R. Pomès, Detergent-mediated protein aggregation. *Chem Phys Lipids* **2013**, *169*, 72-84.
215. S.L. McGovern, E. Caselli, N. Grigorieff, B.K. Shoichet, A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening. *J Med Chem* **2002**, *45* (8), 1712-1722.
216. S.L. McGovern, B.T. Helfand, B. Feng, B.K. Shoichet, A specific mechanism of nonspecific inhibition. *J Med Chem* **2003**, *46* (20), 4265-4272.
217. F.G.R. Ehlert, K. Linde, W.E. Diederich, What Are We Missing? The Detergent Triton X-100 Added to Avoid Compound Aggregation Can Affect Assay Results in an Unpredictable Manner. *ChemMedChem* **2017**, *12* (17), 1419-1423.
218. W. Lian, B. Jiang, Z. Qian, D. Pei, Cell-permeable bicyclic peptide inhibitors against intracellular proteins. *J Am Chem Soc* **2014**, *136* (28), 9830-9833.

219. B. Ramos-Molina, A.N. Lick, A. Nasrolahi Shirazi, D. Oh, R. Tiwari, N.S. El-Sayed, K. Parang, I. Lindberg, Cationic Cell-Penetrating Peptides Are Potent Furin Inhibitors. *PLoS One* **2015**, *10* (6), e0130417.
220. K. Harges, T. Ivanova, B. Thaa, G.M. McInerney, T.I. Klock, K. Sandvig, S. Künzel, I. Lindberg, T. Steinmetzer, Elongated and Shortened Peptidomimetic Inhibitors of the Proprotein Convertase Furin. *ChemMedChem* **2017**, *12* (8), 613-620.
221. K. Desale, K. Kuche, S. Jain, Cell-penetrating peptides (CPPs): an overview of applications for improving the potential of nanotherapeutics. *Biomater Sci* **2021**, *9* (4), 1153-1188.
222. S.E. Park, M.I. Sajid, K. Parang, R.K. Tiwari, Cyclic Cell-Penetrating Peptides as Efficient Intracellular Drug Delivery Tools. *Molecular Pharmaceutics* **2019**, *16* (9), 3727-3743.
223. H. Derakhshankhah, S. Jafari, Cell penetrating peptides: A concise review with emphasis on biomedical applications. *Biomed Pharmacother* **2018**, *108*, 1090-1096.
224. M. Lindgren, M. Hällbrink, A. Prochiantz, U. Langel, Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol Sci* **2000**, *21* (3), 99-103.
225. T. Ivanova, K. Harges, S. Kallis, S.O. Dahms, M.E. Than, S. Künzel, E. Böttcher-Friebertshäuser, I. Lindberg, G.S. Jiao, R. Bartenschlager, T. Steinmetzer, Optimization of Substrate-Analogue Furin Inhibitors. *ChemMedChem* **2017**, *12* (23), 1953-1968.
226. S. Lorey, A. Stöckel-Maschek, J. Faust, W. Brandt, B. Stiebitz, M.D. Gorrell, T. Kühne, C. Mrestani-Klaus, S. Wrenger, D. Reinhold, S. Ansorge, K. Neubert, Different modes of dipeptidyl peptidase IV (CD26) inhibition by oligopeptides derived from the N-terminus of HIV-1 Tat indicate at least two inhibitor binding sites. *Eur J Biochem* **2003**, *270* (10), 2147-2156.
227. R.G. Junqueira, E. Silva, M. Mares-Guia, Competitive parabolic inhibition of bovine trypsin by bis-benzamides. *Braz J Med Biol Res* **1992**, *25* (9), 873-887.
228. G.L. Becker, Y. Lu, K. Harges, B. Strehlow, C. Levesque, I. Lindberg, K. Sandvig, U. Bakowsky, R. Day, W. Garten, T. Steinmetzer, Highly potent inhibitors of proprotein convertase furin as potential drugs for treatment of infectious diseases. *J Biol Chem* **2012**, *287* (26), 21992-22003.
229. A.F.B. Räder, F. Reichart, M. Weinmüller, H. Kessler, Improving oral bioavailability of cyclic peptides by N-methylation. *Bioorg Med Chem* **2018**, *26* (10), 2766-2773.
230. T.V. Lam van, M.R. Heindl, C. Schlutt, E. Böttcher-Friebertshäuser, R. Bartenschlager, G. Klebe, H. Brandstetter, S.O. Dahms, T. Steinmetzer, The Basicity Makes the Difference: Improved Canavanine-Derived Inhibitors of the Proprotein Convertase Furin. *ACS Med Chem Lett* **2021**, *12* (3), 426-432.
231. T.A. Wani, A.H. Bakheit, M.A. Abounassif, S. Zargar, Study of Interactions of an Anticancer Drug Neratinib With Bovine Serum Albumin: Spectroscopic and Molecular Docking Approach. *Front Chem* **2018**, *6*, 47.
232. S.V. Rajkumar, S. Kumar, Multiple myeloma current treatment algorithms. *Blood Cancer J* **2020**, *10* (9), 94.
233. C. Nitsche, H. Onagi, J.P. Quek, G. Otting, D. Luo, T. Huber, Biocompatible Macrocyclization between Cysteine and 2-Cyanopyridine Generates Stable Peptide Inhibitors. *Org Lett* **2019**, *21* (12), 4709-4712.
234. M.A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, S.L. Goodman, H. Kessler, N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective alpha(V)beta(3) integrin antagonists. *J Med Chem* **1999**, *42* (16), 3033-3040.
235. M.S. Bernatowicz, Y. Wu, G.R. Matsueda, Urethane protected derivatives of 1-guanylpiperazine for the mild and efficient preparation of guanidines. *Tetrahedron Letters* **1993**, *34* (21), 3389-3392.
236. H.S. Lee, J.S. Park, B.M. Kim, S.H. Gellman, Efficient synthesis of enantiomerically pure beta2-amino acids via chiral isoxazolidinones. *J Org Chem* **2003**, *68* (4), 1575-1578.
237. Y. Ueno, H. Setoi, M. Okawara, Deacylative condensation I. A new facile method for the direct α -methylenation of ester or lactone starting from monosubstituted active methylene compounds. *Tetrahedron Letters* **1978**, *19* (39), 3753-3756.
238. J.J. Díaz-Mochón, L. Bialy, M. Bradley, Full orthogonality between Dde and Fmoc: the direct synthesis of PNA-peptide conjugates. *Org Lett* **2004**, *6* (7), 1127-1129.
239. J.N. Moorthy, N. Singhal, Facile and highly selective conversion of nitriles to amides via indirect acid-catalyzed hydration using TFA or AcOH-H₂SO₄. *J Org Chem* **2005**, *70* (5), 1926-1929.
240. K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriou, Y. Wenqing, W. Schäfer, Darstellung geschützter peptidfragmente unter einsetz substituierter triphenylmethyl-harze. *Tetrahedron Letters* **1989**, *30* (30), 3943-3946.
241. D.S. Matteson, K.M. Sadhu, Synthesis of 1-amino-2-phenylethane-1-boronic acid derivatives. *Organometallics* **1984**, *3* (4), 614-618.
242. O. Pilgram, Entwicklung von Inhibitoren wirtseigener Serinproteasen zur antiviralen Therapie. Dissertation, Philipps-Universität Marburg, 2021.
243. B.E. Daniels, C.E. Stivala, A solid-phase approach for the synthesis of α -aminoboronic acid peptides. *RSC Adv* **2018**, *8* (6), 3343-3347.
244. S. Hinkes, A. Wuttke, S.M. Saupe, T. Ivanova, S. Wagner, A. Knörlein, A. Heine, G. Klebe, T. Steinmetzer, Optimization of Cyclic Plasmin Inhibitors: From Benzamides to Benzylamines. *J Med Chem* **2016**, *59* (13), 6370-6386.
245. A. Maiwald, Synthese und Charakterisierung substratanaloger Inhibitoren der Serinproteasen Matriptase und Kallikrein 7. Dissertation, Philipps-Universität Marburg, 2017.
246. P. Walsmann, On the purification of thrombin preparations. *Die Pharmazie* **1968**, *23* (7), 401-402.
247. D. Meyer, F. Sielaff, M. Hammami, E. Böttcher-Friebertshäuser, W. Garten, T. Steinmetzer, Identification of the first synthetic inhibitors of the type II transmembrane serine protease TMPRSS2 suitable for inhibition of influenza virus activation. *Biochem J* **2013**, *452* (2), 331-343.
248. M.M. Kacprzak, J.R. Peinado, M.E. Than, J. Appel, S. Henrich, G. Lipkind, R.A. Houghten, W. Bode, I. Lindberg, Inhibition of furin by polyarginine-containing peptides: nanomolar inhibition by nona-D-arginine. *J Biol Chem* **2004**, *279* (35), 36788-36794.
249. G.L. Becker, Entwicklung, Synthese und Charakterisierung neuartiger Furininhibitoren. Dissertation, Philipps-Universität Marburg, 2011.
250. M.J. Castillo, K. Nakajima, M. Zimmerman, J.C. Powers, Sensitive substrates for human leukocyte and porcine pancreatic elastase: a study of the merits of various chromophoric and fluorogenic leaving groups in assays for serine proteases. *Anal Biochem* **1979**, *99* (1), 53-64.
251. A.M.R. Smith, D. Billen, K.K. Hii, Palladium-catalysed enantioselective α -hydroxylation of β -ketoesters. *Chemical Communications* **2009**, (26), 3925-3927.
252. D.B. Ramachary, C. Venkaiah, Y.V. Reddy, High-yielding sequential one-pot synthesis of chiral and achiral α -substituted acrylates via a metal-free reductive coupling reaction. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2014**, *12* (29), 5400-5406.
253. B.G. McCarthy, N.S. MacArthur, C.E. Jakobsche, A simple synthesis of 6-hydroxynorleucine based on the rearrangement of an N-nitrosodichloroacetamide. *Tetrahedron Letters* **2016**, *57* (4), 502-504.

7 Anhang

7.1 Summary in English

The proteolytically active complex of the viral proteins NS2B and NS3 is called flavivirin. Flavivirin is a serine protease with trypsin-like substrate specificity and is involved in the processing of the polyprotein of all flavivirus species. Since the processing of the polyprotein is essential for flavivirus replication, flavivirin is considered a target for antiviral drug development.

Compound **42** (figure 1) is a cyclic flavivirin inhibitor developed by the STEINMETZER group. The inhibitory effect on the protease of Zika (ZIKV), West Nile (WNV) and Dengue 4 viruses (DENV4) is in the nanomolar range *in vitro*. Nevertheless, the inhibitor **42** shows only a small effect on ZIKV propagation in cell culture.

In order to identify possible modifications of compound **42**, 98 derivatives were synthesised and their inhibition constants were determined with the ZIKV and the WNV protease. During this SAR study, only one position or functional group was changed per derivative in order to understand the effect of each modification. The SAR study was supported by S. HUBER and the LUO group (NTU Singapore), who determined a total of 23 crystal structures of inhibitors in complex with the ZIKV protease. Accordingly, a structure-based inhibitor design was possible. The modification options are summarised in figure 1. In investigations *in cellulo* by D. BENDER and R.O. MURRA (HILDT group, Paul-Ehrlich-Institut, Langen), no higher inhibition of ZIKV propagation was determined for any of the individually modified compounds than for lead structure **42**. However, for some compounds with increased lipophilicity, a similar inhibitory effect was found.

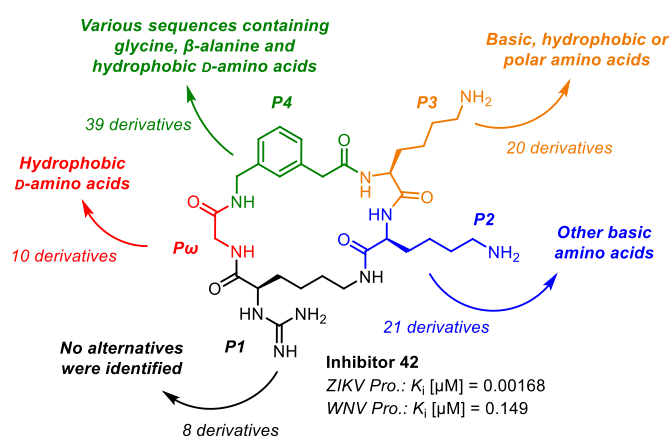


Figure 1 Starting from inhibitor **42** as the lead structure, 98 derivatives were prepared. By determination of the inhibitory effect on the ZIKV and the WNV proteases, the specified residues or segments were identified as useful for further optimisation.

Based on these findings, two series of combined derivatives were synthesised: In a first series, 20 inhibitors with high lipophilicity were designed. In a second series, 10 inhibitors based on cyclic cell-penetrating peptides were developed. For the inhibitors of the second series, a significant increase in the antiviral effect compared with the starting compound **42** was observed in cell culture experiments: The compounds **C-122** and **C-125** (figure 2) inhibit the ZIKV replication at a concentration of 40 μM with similar effectiveness like ribavirin at a concentration of 100 μM .

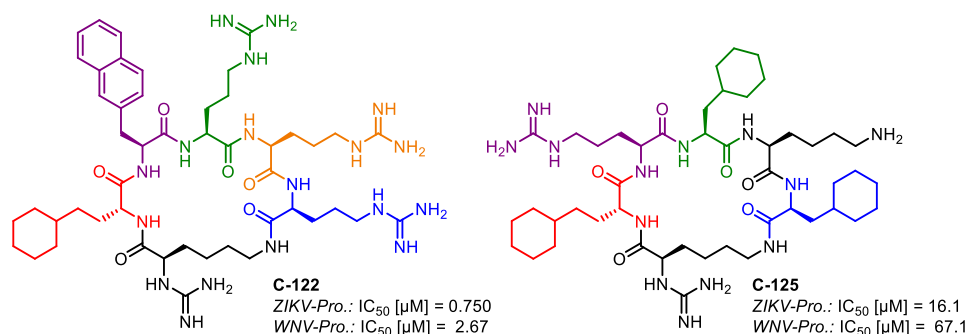


Figure 2 The inhibitors **C-122** and **C-125** were developed based on cell-penetrating peptides and show a similarly high level of activity against ZIKV propagation *in cellulo* as ribavirin.

Furthermore, a high selectivity for flavivirin was determined for the individually modified and the combined derivatives: The serine proteases trypsin, thrombin and factor Xa are inhibited at least one order of magnitude less effectively than flavivirin.

Finally, eight covalent flavivirin inhibitors were prepared. These compounds were derived from the cyclic inhibitors and have a boroleucine as the P1 residue. The covalent binding mode of the most potent inhibitor of this series (**B-5**, figure 3) was confirmed by determination of a crystal structure in complex with the ZIKV protease. Inhibitor **B-5** is the first known covalent inhibitor of the ZIKV protease with a K_i value < 10 nM.

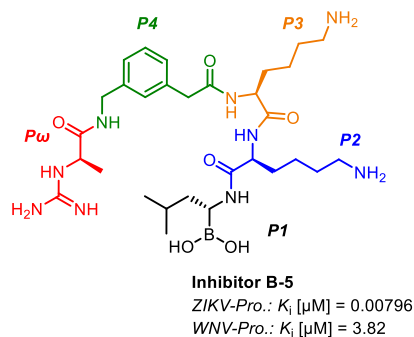


Figure 3 The linear inhibitor **B-5** developed in this work binds covalently to the serine of the catalytic triad.

7.2 Publikationen und Konferenzbeiträge

In wissenschaftlichen Zeitschriften veröffentlichte Publikationen

S. Huber, N.J. Braun, L.C. Schmacke, J.P. Quek, R. Murra, D. Bender, E. Hildt, D. Luo, A. Heine, T. Steinmetzer, Structure-Based Optimization and Characterization of Macrocyclic Zika Virus NS2B-NS3 Protease Inhibitors, *J Med Chem* **2022**, *65* (9), 6555-6572;

N.J. Braun, J.P. Quek, S. Huber, J. Kouretova, D. Rogge, H. Lang-Henkel, E.Z.K. Cheong, B.L.A. Chew, A. Heine, D. Luo, T. Steinmetzer, Structure-Based Macrocyclization of Substrate Analogue NS2B-NS3 Protease Inhibitors of Zika, West Nile and Dengue viruses, *ChemMedChem* **2020**, *15* (15), 1439-1452.

S. Hammerschmidt, S. Huber, N.J. Braun, M. Lander, T. Steinmetzer, C. Kersten, Thermodynamic characterization of a macrocyclic Zika virus NS2B/NS3 protease inhibitor and its acyclic analogues, *Arch Pharm* **2022**, e2200518.

N.J. Braun, S. Huber, L.C. Schmacke, A. Heine, T. Steinmetzer, Boroleucine-Derived Covalent Inhibitors of the ZIKV Protease, *ChemMedChem* **2023**, *18*, e202200336.

Konferenzbeiträge (Vorträge und Poster)

N.J. Braun, S. Huber, L.C. Schmacke, R.O. Murra, D. Bender, E. Hildt, A. Heine, T. Steinmetzer, Macrocyclic Inhibitors of the Zika Virus Protease: Synthesis, Structure-Activity Relationship and Crystal Structure Determination, Poster zur DPhG-Jahrestagung, Philipps-Universität Marburg, 13. bis 17. September 2022.

N.J. Braun, Development of new macrocyclic inhibitors of the Zika Virus protease, Vortrag auf dem "4th Retreat of the LOEWE Center DRUID", Schloss Rauischholzhausen, 18. November 2021.

S. Huber, N.J. Braun, J. Kouretova, D. Rogge, H. Lang-Henkel, T. Steinmetzer, Macrocyclic Active Site-directed Inhibitors of the Zika NS2B-NS3 Protease, Poster zum DFG-FAPESP-Workshop "Protease Research in Chemistry and Biology: Focus on Neglected Tropical Diseases", Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, 23. bis 25. Juli 2019.

7.3 Abbildungen

Abbildung 1.1 Übertragungszyklen von Flaviviren.....	2
Abbildung 1.2 Aufbau flaviviraler Virionen (A) und des flaviviralen (M-E)-Dimers (B).....	4
Abbildung 1.3 Flaviviraler Replikationszyklus	5
Abbildung 1.4 Das flavivirale Polyprotein	6
Abbildung 1.5 Konservierung der Primärstruktur des Flavivirins	9
Abbildung 1.6 Struktur der ZIKV-Protease im Komplex mit dem Liganden 1	10
Abbildung 1.7 Tertiärstruktur des Flavivirins.	13
Abbildung 1.8 Erste peptidische Inhibitoren des Flavivirins	19
Abbildung 1.9 Peptidische Inhibitoren der WNV- und ZIKV-Protease	20
Abbildung 1.10 Peptidomimetische Inhibitoren der DENV-Protease.	21
Abbildung 1.11 Optimierungsserie von DENV2-Inhibitoren nach KLEIN <i>et al.</i>	23
Abbildung 1.12 Cyclische Peptide mit kompetitiver Hemmwirkung auf Flavivirin.....	25
Abbildung 1.13 Peptid-Metall-Komplexe als Inhibitoren des Flavivirins	26
Abbildung 1.14 Kristallstrukturen peptidischer Inhibitoren im Komplex mit Flavivirin.....	26
Abbildung 1.15 Niedermolekulare kompetitive Flavivirininhibitoren.....	30
Abbildung 1.16 Postulierte allosterische Bindungsstellen des Flavivirins	31
Abbildung 1.17 Eine Auswahl allosterischer Inhibitoren des Flavivirins.....	33
Abbildung 2.1 In dieser Arbeit benutzte Ausrichtung und Nomenklatur von Aminosäureresten.....	35
Abbildung 2.2 Inhibitor 8e als Ausgangspunkt für die Entwicklung cyclischer Flavivirininhibitoren.	36
Abbildung 2.3 Optimierung substratanaloger, makrocyclischer Flavivirininhibitoren in der AG STEINMETZER.....	37
Abbildung 2.4 Komplexkristallstrukturen erster makrocyclischer Flavivirininhibitoren	38
Abbildung 2.5 Inhibitor 42 im Komplex mit der ZIKV-Protease.....	40
Abbildung 2.6 Ziel dieser Arbeit.....	42
Abbildung 3.1 MS-Spektren einiger Inhibitoren nach Inkubation mit und ohne die ZIKV-Protease	48
Abbildung 3.2 AMC-Substrate für enzymkinetische Messungen.....	49
Abbildung 3.3 AMC-Substrat 53 für enzymkinetische Messungen mit der DENV2-Protease.....	50
Abbildung 3.4 Enzymkinetische Charakterisierung der ZIKV-Protease und des Inhibitors 42	51
Abbildung 3.5 Enzymkinetische Charakterisierung der WNV-Protease und des Inhibitors 42	52
Abbildung 3.6 Enzymkinetische Charakterisierung der DENV2-Protease und des Inhibitors 42	53
Abbildung 3.7 Kristallstrukturen der linearen Referenzverbindungen	55
Abbildung 3.8 Kristallstrukturen P ω -modifizierter Derivate.....	61
Abbildung 3.9 Komplexkristallstrukturen von Inhibitoren mit linearem Linkersegment	64
Abbildung 3.10 Kristallstruktur des Inhibitors C-25 im Komplex mit der ZIKV-Protease.....	67
Abbildung 3.11 Komplexkristallstrukturen P4-modifizierter Derivate des Inhibitors C-15	71
Abbildung 3.12 Kristallstruktur des Inhibitors C-44 im Komplex mit der ZIKV-Protease.....	74
Abbildung 3.13 Komplexkristallstrukturen P3-modifizierter Derivate des Inhibitors 42	79

Abbildung 3.14 Komplexkristallstrukturen P2-modifizierter Derivate des Inhibitors 42	83
Abbildung 3.15 Enzymkinetische Charakterisierung der Inhibitoren C-109 und C-114 bis C-116	91
Abbildung 3.16 Auftragung von $1/v$ gegen die Inhibitorkonzentration von C-109 und C-114 bis C-116	92
Abbildung 3.17 Hemmung der ZIKV-Protease durch die Inhibitoren C-117 und C-118	93
Abbildung 3.18 Vorgehen zur Berechnung eines $K_{i,calc}$ -Wertes	95
Abbildung 3.19 Komplexkristallstrukturen kombinierter lipophiler Inhibitoren	97
Abbildung 3.20 Beispiele für zellpenetrierende Inhibitoren und Peptide.....	100
Abbildung 3.21 Dosis-Wirkungs-Kurven des Inhibitors C-122	103
Abbildung 3.22 Methylierte Derivate der Inhibitoren C-14 und 42	105
Abbildung 3.23 Stabilität der Inhibitoren 42 und C-8 unter Zellkulturbedingungen	110
Abbildung 3.24 Untersuchung der Inhibitorbindung an bovines Serumalbumin	111
Abbildung 3.25 Untersuchung des antiviralen Effekts linkermodifizierter Inhibitoren	111
Abbildung 3.26 Einfluss der Inhibitoren 42 bzw. C-8 auf das NS1- und das E-Protein	112
Abbildung 3.27 Untersuchung des antiviralen Effekts P3- und P2-modifizierter Inhibitoren.....	113
Abbildung 3.28 Effekt einiger potentiell zellpenetrierender Inhibitoren auf die metabolische Aktivität	114
Abbildung 3.29 Untersuchung des antiviralen Effekts zellpenetrierender Inhibitoren.....	115
Abbildung 3.30 Strukturen der Inhibitoren C-122 und C-125	115
Abbildung 3.31 Die Proteasominhibitoren Bortezomib und Ixazomib.	116
Abbildung 3.32 Die Entwicklung linearer, kovalenter Flavivirininhibitoren	117
Abbildung 3.33 Struktur des Inhibitors B-5 im Komplex mit der ZIKV-Protease.....	120
Abbildung 3.34 HPLC-Chromatogramme der Intermediate 65 bis 67 und des Inhibitors 42	124
Abbildung 3.35 HPLC-Chromatogramme der P ω -modifizierter Inhibitoren.....	126
Abbildung 3.36 HPLC-Chromatogramme der Inhibitoren C-44 und C-45 sowie ihrer Vorstufen	129
Abbildung 3.37 ESI ⁺ -Massenspektrum des Inhibitors B-5	144
Abbildung 4.1 Ausgehend vom Inhibitor 42 als Leitstruktur wurden 98 einzelmodifizierte Derivate hergestellt	148
Abbildung 4.2 Einige cyclische Flavivirininhibitoren, die in dieser Arbeit entwickelt wurden	148
Abbildung 4.3 Untersuchung des antiviralen Effekts.....	149
Abbildung 4.4 Beispiele für kombinierte Derivate	150
Abbildung 4.5 Der in dieser Arbeit entwickelte Inhibitor B-5	151
Abbildung 4.6 Korrelation zwischen den K_i - bzw. IC_{50} -Werten der ZIKV- und der WNV-Protease	151
Abbildung 5.1 Kalibriergerade zur Umrechnung der relativen Fluoreszenz in eine AMC-Konzentration.....	158

7.4 Tabellen

Tabelle 1.1 Verbreitung und Übertragung einiger humanpathogener Flaviviren	1
Tabelle 1.2 Peptide und Peptidderivate mit kompetitiver Hemmwirkung auf Flavivirin	16
Tabelle 1.3 Niedermolekulare kompetitive Flavivirininhibitoren	29
Tabelle 1.4 Allosterische Inhibitoren des Flavivirins.....	32
Tabelle 3.1 Cyclische Inhibitoren des Flavivirins mit 4-Amphac in P4-Position	45
Tabelle 3.2 Hemmung des Flavivirins durch cyclische Inhibitoren mit 3-Amphac in P4-Position.....	47
Tabelle 3.3 pH-Abhängigkeit der enzymkinetischen Parameter des Substrats 52	50
Tabelle 3.4 Lineare Analoga der Leitstruktur 42	54
Tabelle 3.5 P ω -modifizierte Derivate der Leitstruktur 42	57
Tabelle 3.6 Derivate des Inhibitors 42 mit linearem Linkersegment	62
Tabelle 3.7 Derivate des Inhibitors C-16 mit variiertem P5- oder P4-Rest.....	66
Tabelle 3.8 Inhibitoren mit Linkersegmenten aus vier α -Aminosäuren	67
Tabelle 3.9 Derivate des Inhibitors C-15 mit variiertem P4-Rest.....	68
Tabelle 3.10 P4-modifizierte Derivate des Inhibitors C-14	73
Tabelle 3.11 Inhibitoren mit Linkersegmenten aus je einer einzelnen Aminosäure.....	75
Tabelle 3.12 P3-modifizierte Derivate des Inhibitors 42	77
Tabelle 3.13 P2-modifizierte Derivate der Leitstruktur 42	81
Tabelle 3.14 Derivate des Inhibitors 42 mit variiertem P1-Funktionalität.....	85
Tabelle 3.15 Inhibitoren ohne guanyliertes D-Lysin als P1-Rest	86
Tabelle 3.16 Derivate des Inhibitors C-14 mit modifiziertem P ω -Rest.	86
Tabelle 3.17 Derivate des Inhibitors C-7	88
Tabelle 3.18 Derivate des Inhibitors C-39	89
Tabelle 3.19 Zeitabhängigkeit der IC ₅₀ -Werte und der Hill-Koeffizienten einiger Inhibitoren	90
Tabelle 3.20 Derivate der Inhibitoren C-44 und C-45 mit 2-Naphthylalanin als P3-Rest	93
Tabelle 3.21 Durch Reihenentwicklung berechnete ($K_{i,calc}$)-Werte	94
Tabelle 3.22 Argininreiche Inhibitoren mit hydrophobem Segment	101
Tabelle 3.23 Inhibitoren mit alternierend hydrophoben und basischen Resten	101
Tabelle 3.24 Methylierte Derivate der Inhibitoren C-14 und 42	105
Tabelle 3.25 Hemmwirkung ausgewählter Inhibitoren auf Furin	106
Tabelle 3.26 Hemmwirkung ausgewählter Inhibitoren auf Faktor Xa, Thrombin und Trypsin	108
Tabelle 3.27 CC ₅₀ -Werte einer Auswahl einzelmodifizierter Inhibitoren	109
Tabelle 3.28 Lineare Inhibitoren des Flavivirins mit Boroleucin als P1-Rest.....	118
Tabelle 3.29 Analoga des Inhibitors B-5 ohne Boronsäurefunktion	119
Tabelle 3.30 Selektivität des Inhibitors B-5	121
Tabelle 5.1 Analytische Daten der linkermodifizierten Inhibitoren	167
Tabelle 5.2 Analytische Daten der P3- bzw. P2-Inhibitoren.....	172

Tabelle 5.3 Analytische Daten der Inhibitoren C-94 bis C-98	176
Tabelle 5.4 Analytische Daten der Inhibitoren C-99 bis C-102	177
Tabelle 5.5 Analytische Daten der Inhibitoren C-105 bis C-109	178
Tabelle 5.6 Synthese und analytische Daten der Inhibitoren C-110 bis C-116	179
Tabelle 5.7 Analytische Daten der Inhibitoren C-117 und C-118	180
Tabelle 5.8 Analytische Daten der Inhibitoren C-119 bis C-128	181
Tabelle 5.9 Analytische Daten der Inhibitoren B-1 bis B-8	184
Tabelle 5.10 Analytische Daten der Inhibitoren L-1 und L-2	185
Tabelle 7.1 Inhibitoren nach Nummer	X
Tabelle 7.2 Cyclische Inhibitoren nach MI-Nummer	XIII

7.5 Schemata

Schema 3.1 Synthese der Leitstruktur 42	123
Schema 3.2 Synthese der linkermodifizierten Inhibitoren C-1 bis C-49	125
Schema 3.3 Synthese der Inhibitoren C-30 und C-31	127
Schema 3.4 Synthese von DL- β^2 -Homophenylalanin	128
Schema 3.5 Synthese der Inhibitoren C-44 und C-45	128
Schema 3.6 Synthese der P3- und P2-modifizierten Inhibitoren C-50 bis C-90	130
Schema 3.7 Synthese der Inhibitoren C-52 , C-53 , C-73 und C-74	131
Schema 3.8 Synthese des Fmoc-Nle(ϵ -OH)-OH	132
Schema 3.9 Synthese der Inhibitoren C-56 und C-77	133
Schema 3.10 Synthese der Inhibitoren mit 3-Aminotyrosin in P3- (C-58) bzw. P2-Position (C-79)	134
Schema 3.11 Synthese der Inhibitoren C-60 und C-81	135
Schema 3.12 Synthese des Inhibitors C-92	136
Schema 3.13 Synthese des Inhibitors C-93	136
Schema 3.14 Synthese der Inhibitoren C-94 bis C-98	137
Schema 3.15 Synthese der Inhibitoren C-117 und C-118	138
Schema 3.16 Synthese der potentiell zellpenetrierenden Inhibitoren C-119 bis C-123	139
Schema 3.17 Synthese der Inhibitoren C-124 bis C-126	139
Schema 3.18 Synthese der Inhibitoren C-127 und C-128	140
Schema 3.19 Synthese der linearen Referenzverbindungen L-1 und L-2	141
Schema 3.20 Synthese der linearen Referenzverbindung L-3	141
Schema 3.21 Synthese der linearen Referenzverbindungen L-4 bis L-6	142
Schema 3.22 Synthese des Inhibitors B-5	143

7.6 Abkürzungen

	2-Chlortrityl-Harz	DMF	Dimethylformamid
	Quervernetztes Polystyrolharz	DMSO	Dimethylsulfoxid
(+)	Positive Leserichtung (bei Nukleinsäuren)	DTT	Dithiothreitol
(-)	Negative Leserichtung (bei Nukleinsäuren)	ε -Aca	ε -Aminocaprinsäure (<i>ε-Aminocapronic acid</i>)
1-Nal	1-Naphthylalanin	EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
2-CTC	2-Chlortritylchlorid	EC ₆₈	Achtundsechzigprozentige effektive Konzentration
2-Nal	2-Naphthylalanin	EC ₉₀	Neunzigprozentige effektive Konzentration
3-Amphac	3-Aminomethylphenyllessigsäure	EM	Elektronenmikroskopie
3-Aphac	3-Aminophenyllessigsäure	EMA	<i>European Medicines Agency</i>
4-Amphac	4-Aminomethylphenyllessigsäure	E-Protein	Hüllprotein (<i>Envelope protein</i>)
Å	Ångström ($1 \text{ \AA} = 0,1 \text{ nm}$)	ER	Endoplasmatisches Retikulum
Ac	Acetyl	ESI	Elektrospray-Ionisierung
Ae.	<i>Aedes</i>	Et	Ethyl
AG	Arbeitsgruppe	FCS	Fötales Kälberserum (<i>Fetal calf serum</i>)
AMC	7-Amino-4-methylcumarin	FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
Äq.	Äquivalente	Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
Ausb.	Ausbeute	FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
b	Harzbeladung	γ -Abu	γ -Aminobuttersäure
β^2 -hPhe	β^2 -Homophenylalanin	GAG	Glykosaminoglykan
β -Ala	β -Alanin	GCMA	<i>trans</i> -(4-Guanidino)cyclohexylmethylamid
ber.	berechnet	GE	Genom-Äquivalente
Ble	Boroleucin	gef.	gefunden
Bn	Benzyl	hAgm	Homoagmatin
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl	hArg	Homoarginin
BPTI	Boviner pankreatischer Trypsininhibitor	HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
BSA	Bovines Serumalbumin	hCha	Homocyclohexylalanin
Bzls	Benzylsulfonyl	HCV	Hepatitis-C-Virus
C.	<i>Culex</i>	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Cam	Carboxamidino	HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
Cbz	Benzylloxycarbonyl	hPhe	Homophenylalanin
CC ₅₀	Mittlere cytotoxische Konzentration	HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>High performance liquid chromatography</i>)
Cha	Cyclohexylalanin	HTS	Hochdurchsatzscreening (<i>High throughput screening</i>)
CHIKV	Chikungunya-Virus	<i>I.</i>	<i>Ixodes</i>
Cit	Citrullin	IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
C-Protein	Capsid-Protein	Inh.	Inhibitor
Cy	Cyclohexyl	Int.	Intermediat
CZS	Angeborenes Zika-Syndrom (<i>Congenital Zika Syndrome</i>)	JEV	Japanische-Enzephalitis-Virus
DI/DII/DIII	DI/DII/DIII-Domäne des Hüllproteins	kat.	katalytisch
Dab	L-2,4-Diaminobuttersäure	k_{cat}	Wechselzahl
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	K_i	Hemmkonstante
δ -Ava	δ -Aminovaleriansäure (<i>δ-Aminovaleric acid</i>)	$K_{i,\text{calc}}$	Berechnete Hemmkonstante
DC	Dünnschichtchromatographie	K_M	Michaelis-Menten-Konstante
DCM	Dichlormethan	LC	Flüssigkeitschromatographie (<i>Liquid chromatography</i>)
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>	λ_{em}	Emissionswellenlänge
Dde	2-Acetyldimedon	λ_{ex}	Exzitationswellenlänge
DENV	Dengue-Virus	LHMDS	Lithiumhexamethyldisilazid
DIPEA	Diisopropylethylamin		
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium		

Me	Methyl	SFV	Semliki-Forest-Virus
MeOSuc	Methoxysuccinyl	sgLys	Über die Seitenkette verknüpftes N_{α} -Carboxamidino-Lysin
MI	Marburger Inhibitor (<i>interne Bezeichnung für Inhibitoren aus der AG STEINMETZER</i>)	sgOrn	Über die Seitenkette verknüpftes N_{α} -Carboxamidino-Ornithin
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>	sLys	Über die Seitenkette verknüpftes Lysin mit freiem N -Terminus
M-Protein	Membranprotein	sOrn	Über die Seitenkette verknüpftes Ornithin mit freiem N -Terminus
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>Messenger ribonucleic acid</i>)	suLys	Über die Seitenkette verknüpftes N_{α} -Carbamoyl-Lysin
MS	Massenspektrometrie	<i>spp.</i>	<i>Species pluralis</i>
Ms	Mesyl	SPPS	Festphasenpeptidsynthese (<i>Solid phase peptide synthesis</i>)
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis	ss	Einzelstrang (<i>Single strand</i>)
N	Anzahl der durchgeführten Experimente (<i>nur in Abbildungen</i>)	Su	Succinimidyl
nArg	Norarginin	TAM	<i>Tyro3, Axl and Mer</i>
n.b.	nicht bestimmt	TAT	<i>Trans-Activator of Transcription</i>
Nle	Norleucin	TBEV	FSME-Virus (<i>Tick-borne Encephalitis Virus</i>)
NMP	N -Methyl-2-pyrrolidon	TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
NS	Nicht-strukturelles Protein	<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -Butyl
ORF	Offener Leserahmen (<i>Open reading frame</i>)	TFA	Trifluoressigsäure (<i>Trifluoroacetic acid</i>)
Orn	Ornithin	THF	Tetrahydrofuran
p	Hill-Koeffizient (<i>nur in Bezug auf Enzymkinetik</i>)	TIM	<i>T cell/transmembrane, immunoglobulin, and mucin</i>
<i>p</i>	<i>p</i> -Wert (<i>für statistische Signifikanz</i>)	TIS	Triisopropylsilan
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl	TM	Trans-Membran
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i>)	TMS	Trimethylsilyl
PDB	Protein Data Bank https://www.rcsb.org/	TOT	Transovariale Transmission
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Ph	Phenyl	Trt	Tryl
Phac	Phenylelessigsäure	UTR	Untranslatierte Region
Phg	Phenylglycin	VP	Vesikelpaket (<i>Vesicle packet</i>)
p.i.	Nach Infizierung (<i>post infectionem</i>)	WNV	West-Nil-Virus
präp.	präparativ	WT	Wildtyp
prM	Prä-Membran-Protein	Xaa	<i>Platzhalter für eine α-Aminosäure</i>
Pro.	Protease	YFV	Gelbfieber-Virus (<i>Yellow Fever Virus</i>)
PTFE	Polytetrafluorethylen	ZIKV	Zika-Virus
RFU	Relative Fluoreszenzeinheit (<i>Relative fluorescence unit</i>)	ZNS	Zentrales Nervensystem
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)		
RT	Zimmertemperatur (<i>Room temperature</i>)		
SAR	Struktur-Wirkungs-Beziehung (<i>Structure activity relationship</i>)		
Sar	Sarkosin		

7.7 Inhibitoren nach Nummer

Tabelle 7.1 Inhibitoren nach Nummer. Die Inhibitoren **38** bis **56** wurden nicht im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und sind nur der Vollständigkeit halber aufgeführt. Einige Inhibitoren wurden von L.C. SCHMACKE im Rahmen ihrer Masterarbeit auf Anregung des Verfassers hergestellt, siehe dazu Tabelle 7.2 (S.XIII). Sofern eine Kristallstruktur im Komplex mit der ZIKV-Protease existiert, so ist der zugehörige PDB-Code angegeben. Ein „g“ vor der Aminosäureabkürzung symbolisiert einen guanylierten *N*-Terminus, ein „s“ eine Verknüpfung der P1-Seitenkette mit dem C-Terminus des P2-Rests, ein „u“ eine Harnstoffgruppe anstelle einer Aminogruppe am *N*-Terminus.

Nr.	MI	PDB	Zu finden in Tab. (S.)	Pw	P6	P5	P4	P3	P2	P1	K _i [μM]	
											ZIKV-Pro.	WNV-Pro.
38	1240	6KK2	3.1 (45)	γ-Abu	-	-	4-Amphac	Lys	Lys	sgLys	0,0918	6,30
39	2108	6KK3	3.1 (45)	γ-Abu	-	-	4-Amphac	Lys	Lys	d-sgLys	0,0701	4,97
40	2112	6KPQ	3.2 (47)	γ-Abu	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	d-sgLys	0,00433	0,702
41	2111	6KK4	3.2 (47)	β-Ala	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	d-sgLys	0,00388	0,374
42	2110	6Y3B	3.2 (47)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	d-sgLys	0,00168	0,149
43	1239	/	3.1 (45)	γ-Abu	-	-	4-Amphac	Lys	Lys	sgOrn	0,846	27,8
44	2109	/	3.1 (45)	γ-Abu	-	-	4-Amphac	Lys	Lys	d-sgOrn	3,61	22,0
45	2106	/	3.1 (45)	γ-Abu	-	-	4-Amphac	Lys	Lys	d-sLys	24,7	68,1
46	2107	/	3.1 (45)	γ-Abu	-	-	4-Amphac	Lys	Lys	d-sOrn	13,2	31,7
47	759	/	3.2 (47)	3-Amphac	-	-	-	Lys	Lys	d-sgLys	0,0373	15,3
48	2114	/	3.2 (47)	Gly	-	-	3-Aphac	Lys	Lys	d-sgLys	1,42	47,6
49	2137	/	3.2 (47)	3-Amphac	-	-	Gly	Lys	Lys	d-sgLys	0,0412	1,76
50	2138	/	3.2 (47)	3-Amphac	-	-	β-Ala	Lys	Lys	d-sgLys	0,0814	56,5
54	2113	7ZMI	3.4 (54)	H-Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	d-sgLys-OH	2,04	51,6
55	2115	6KK5	3.5 (57)	Ala	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	d-sgLys	0,0182	1,39
56	2116	6KK6	3.5 (57)	D-Ala	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	d-sgLys	0,00352	0,237
B-1	2275	/	3.28 (118)	gGly	-	Gly	3-Amphac	Lys	Lys	Ble-OH	0,0315	2,73
B-2	2273	/	3.28 (118)	H-Gly	-	Gly	3-Amphac	Lys	Lys	Ble-OH	0,294	11,7
B-3	2268	/	3.28 (118)	gGly	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	Ble-OH	0,0114	4,01
B-4	2269	/	3.28 (118)	gAla	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	Ble-OH	0,0114	3,63
B-5	2270	7ZNO	3.28 (118)	D-gAla	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	Ble-OH	0,00796	3,82
B-6	2271	/	3.28 (118)	gβ-Ala	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	Ble-OH	0,0184	0,838
B-7	2149	/	3.28 (118)	-	-	-	Phac	Lys	Lys	Ble-OH	0,845	5,44
B-8	2147	/	3.28 (118)	D-gAla	-	-	3-Amphac	Arg	Lys	Ble-OH	0,0508	3,67
C-1	2226	/	3.2 (47)	γ-Abu	-	-	3-Aphac	Lys	Lys	d-sgLys	0,106	16,5
C-2	2202	/	3.2 (47)	β-Ala	-	-	3-Aphac	Lys	Lys	d-sgLys	0,0802	4,28
C-3	2225	/	3.5 (57)	Val	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	d-sgLys	0,0428	6,71
C-4	2201	7VLG	3.5 (57)	D-Val	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	d-sgLys	0,00774	0,439
C-5	2218	/	3.5 (57)	D-Pro	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	d-sgLys	0,0177	0,850
C-6	2295	7OC2	3.5 (57)	D-Leu	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	d-sgLys	0,00953	0,276
C-7	2267	7PFZ	3.5 (57)	D-Cha	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	d-sgLys	0,00359	0,395
C-8	2191	7PGC	3.5 (57)	D-hCha	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	d-sgLys	0,00233	0,219
C-9	2266	/	3.5 (57)	D-Phe	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	d-sgLys	0,00534	0,693
C-10	2192	/	3.5 (57)	D-hPhe	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	d-sgLys	0,00602	0,331
C-11	2203	/	3.6 (62)	Gly	-	-	ε-Aca	Lys	Lys	d-sgLys	0,0154	0,973
C-12	2204	/	3.6 (62)	Gly	-	-	δ-Ava	Lys	Lys	d-sgLys	0,0167	1,22
C-13	2212	/	3.6 (62)	Gly	-	-	γ-Abu	Lys	Lys	d-sgLys	0,124	6,70
C-14	2220	7VLH	3.6 (62)	Gly	-	Gly	β-Ala	Lys	Lys	d-sgLys	0,00172	0,0686
C-15	2221	7PG1	3.6 (62)	Gly	-	β-Ala	Gly	Lys	Lys	d-sgLys	0,00735	0,468
C-16	2219	7VLI	3.6 (62)	Gly	-	Gly	Gly	Lys	Lys	d-sgLys	0,00374	0,129
C-17	2222	/	3.6 (62)	β-Ala	-	Gly	Gly	Lys	Lys	d-sgLys	0,0128	0,974
C-18	2198	/	3.7 (66)	Gly	-	Gly	Ala	Lys	Lys	d-sgLys	0,0922	1,17
C-19	2197	/	3.7 (66)	Gly	-	Gly	D-Ala	Lys	Lys	d-sgLys	0,187	6,97
C-20	2299	/	3.7 (66)	Gly	-	Gly	Phe	Lys	Lys	d-sgLys	0,0319	0,657
C-21	2199	/	3.7 (66)	Gly	-	Gly	D-Phe	Lys	Lys	d-sgLys	0,139	17,3
C-22	2169	/	3.7 (66)	Gly	-	Phe	Gly	Lys	Lys	d-sgLys	0,0576	4,07
C-23	2168	/	3.7 (66)	Gly	-	D-Phe	Gly	Lys	Lys	d-sgLys	0,0169	0,908
C-24	2163	/	3.8 (67)	Gly	Gly	Gly	Phe	Lys	Lys	d-sgLys	0,315	5,93
C-25	2162	7ZWK	3.8 (67)	Gly	Gly	Gly	D-Phe	Lys	Lys	d-sgLys	0,0144	1,74
C-26	2167	/	3.8 (67)	Gly	Gly	Phe	Gly	Lys	Lys	d-sgLys	0,145	3,32
C-27	2164	/	3.8 (67)	Gly	Gly	D-Phe	Gly	Lys	Lys	d-sgLys	0,204	3,43
C-28	2166	/	3.8 (67)	Gly	Phe	Gly	Gly	Lys	Lys	d-sgLys	0,0399	2,04
C-29	2165	/	3.8 (67)	Gly	D-Phe	Gly	Gly	Lys	Lys	d-sgLys	0,0171	1,32
C-30	2161	/	3.8 (67)	Gly	Gly	Gly	Arg	Lys	Lys	d-sgLys	0,0699	5,30
C-31	2160	/	3.8 (67)	Gly	Gly	Gly	D-Arg	Lys	Lys	d-sgLys	0,00862	1,22
C-32	2240	/	3.9 (68)	Gly	-	β-Ala	Ala	Lys	Lys	d-sgLys	0,075	7,76
C-33	2241	7PFY	3.9 (68)	Gly	-	β-Ala	Val	Lys	Lys	d-sgLys	0,340	39,7
C-34	2242	/	3.9 (68)	Gly	-	β-Ala	Leu	Lys	Lys	d-sgLys	0,124	10,3
C-35	2231	7O55	3.9 (68)	Gly	-	β-Ala	D-Ala	Lys	Lys	d-sgLys	0,00562	1,43
C-36	2232	/	3.9 (68)	Gly	-	β-Ala	D-Val	Lys	Lys	d-sgLys	0,00826	1,68
C-37	2233	/	3.9 (68)	Gly	-	β-Ala	D-Leu	Lys	Lys	d-sgLys	0,00430	1,03
C-38	2247	7PFQ	3.9 (68)	Gly	-	β-Ala	D-Nle	Lys	Lys	d-sgLys	0,00494	0,892

7.7 Inhibitoren nach Nummer

Nr.	MI	PDB	Zu finden in Tab. (S.)	Pw	P6	P5	P4	P3	P2	P1	K _i [μM]	
											ZIKV-Pro.	WNV-Pro.
C-39	2264	/	3.9 (68)	Gly	-	β-Ala	D-Cha	Lys	Lys	D-sgLYs	0,00694	0,735
C-40	2246	/	3.9 (68)	Gly	-	β-Ala	D-Pro	Lys	Lys	D-sgLYs	0,0210	2,59
C-41	2263	/	3.9 (68)	Gly	-	β-Ala	D-Phg	Lys	Lys	D-sgLYs	0,00484	0,371
C-42	2248	7OBV	3.9 (68)	Gly	-	β-Ala	D-Phe	Lys	Lys	D-sgLYs	0,00306	1,92
C-43	2249	/	3.9 (68)	Gly	-	β-Ala	D-hPhe	Lys	Lys	D-sgLYs	0,0103	1,29
C-44	2289	7O2M	3.10 (73)	Gly	-	Gly	D-β ² -hPhe	Lys	Lys	D-sgLYs	0,0630	14,8
C-45	2288	/	3.10 (73)	Gly	-	Gly	β ² -hPhe	Lys	Lys	D-sgLYs	0,0860	6,49
C-46	2216	/	3.11 (75)	ε-Aca	-	-	-	Lys	Lys	D-sgLYs	1,48	63,3
C-47	2215	/	3.11 (75)	δ-Ava	-	-	-	Lys	Lys	D-sgLYs	9,24	239
C-48	2214	/	3.11 (75)	γ-Abu	-	-	-	Lys	Lys	D-sgLYs	11,0	116
C-49	2213	/	3.11 (75)	β-Ala	-	-	-	Lys	Lys	D-sgLYs	7,91	91,8
C-50	2259	7ZW5	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	nArg	Lys	D-sgLYs	0,00225	0,141
C-51	2254	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Arg	Lys	D-sgLYs	0,00334	0,209
C-52	2294	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	Lys	D-sgLYs	0,0454	1,36
C-53	2298	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Phe(4-CH ₂ NH ₂)	Lys	D-sgLYs	0,0178	0,964
C-54	2292	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Gln	Lys	D-sgLYs	0,0524	0,742
C-55	2236	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Cit	Lys	D-sgLYs	0,0525	0,824
C-56	2260	8AQA	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Nle(ε-OH)	Lys	D-sgLYs	0,0331	0,905
C-57	2132	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Tyr	Lys	D-sgLYs	0,197	3,75
C-58	2206	7ZQF	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Tyr(3-NH ₂)	Lys	D-sgLYs	0,187	2,13
C-59	2210	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Tyr(3-NH ₂ , O-C(NH)NH ₂)	Lys	D-sgLYs	0,192	4,72
C-60	2179	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Phe(3-CN)	Lys	D-sgLYs	0,0725	3,04
C-61	2175	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Phe(3-C(O)NH ₂)	Lys	D-sgLYs	0,190	5,87
C-62	2205	7ZQ1	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Trp	Lys	D-sgLYs	0,0344	0,678
C-63	2238	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Phe	Lys	D-sgLYs	0,0593	1,53
C-64	2131	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	hPhe	Lys	D-sgLYs	0,442	3,85
C-65	2230	8A15	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	2-Nal	Lys	D-sgLYs	0,0481	5,09
C-66	2134	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	1-Nal	Lys	D-sgLYs	0,266	3,15
C-67	2186	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Cha	Lys	D-sgLYs	0,0407	1,61
C-68	2228	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Nle	Lys	D-sgLYs	0,0735	1,27
C-69	2239	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Ala	Lys	D-sgLYs	0,0469	0,714
C-70	2148	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Dab	D-sgLYs	0,0129	0,689
C-71	2258	8AQK	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	nArg	D-sgLYs	0,0395	0,803
C-72	2252	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Arg	D-sgLYs	0,0112	0,898
C-73	2293	7ZPD	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	D-sgLYs	0,00269	0,183
C-74	2297	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Phe(4-CH ₂ NH ₂)	D-sgLYs	0,0115	0,852
C-75	2253	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Gln	D-sgLYs	1,97	27,6
C-76	2235	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Cit	D-sgLYs	2,44	75,3
C-77	2262	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Nle(ε-OH)	D-sgLYs	2,64	121
C-78	2135	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Tyr	D-sgLYs	18,2	422
C-79	2207	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Tyr(3-NH ₂)	D-sgLYs	3,71	77,9
C-80	2211	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Tyr(3-NH ₂ ,O- C(NH)NH ₂)	D-sgLYs	0,697	57,1
C-81	2178	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Phe(3-CN)	D-sgLYs	6,92	124
C-82	2174	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Phe(3-C(O)NH ₂)	D-sgLYs	6,62	135
C-83	2257	8AQB	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Trp	D-sgLYs	2,79	69,5
C-84	2237	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Phe	D-sgLYs	8,68	99,7
C-85	2291	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	hPhe	D-sgLYs	39,2	> 500
C-86	2229	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	2-Nal	D-sgLYs	3,06	101
C-87	2290	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	1-Nal	D-sgLYs	20,3	95,5
C-88	2185	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Cha	D-sgLYs	7,83	50,4
C-89	2227	7ZYS	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Nle	D-sgLYs	12,4	99,1
C-90	2255	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Ala	D-sgLYs	52,5	342
C-91	2251	/	3.14 (85)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	sgLYs	0,0450	9,98
C-92	2200	/	3.14 (85)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	D-sLYs	22,6	98,9
C-93	2208	/	3.14 (85)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	D-suLYs	11,7	67,7
C-94	2244	/	3.15 (86)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	-	29,2	> 500
C-95	2250	/	3.15 (86)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	hArg	-	56,9	> 500
C-96	2243	/	3.15 (86)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Orn	-	35,5	> 500
C-97	2245	/	3.15 (86)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Arg	-	34,1	> 500
C-98	2234	/	3.15 (86)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Trp	-	231	> 500
C-99	2189	/	3.16 (86)	D-Cha	-	Gly	β-Ala	Lys	Lys	D-sgLYs	0,103	2,04
C-100	2177	/	3.16 (86)	D-hCha	-	Gly	β-Ala	Lys	Lys	D-sgLYs	0,0366	0,767
C-101	2188	/	3.16 (86)	D-hPhe	-	Gly	β-Ala	Lys	Lys	D-sgLYs	0,0850	1,81
C-102	2130	7ZUM	3.17 (88)	D-Cha	-	-	3-Amphac	Trp	Lys	D-sgLYs	0,299	2,97
C-103	2128	7ZTM	3.17 (88)	D-Cha	-	-	3-Amphac	2-Nal	Lys	D-sgLYs	0,148	8,96
C-104	2133	/	3.17 (88)	D-Cha	-	-	3-Amphac	N-Me-2-Nal	Lys	D-sgLYs	0,435	7,94
C-105	2195	7ZV4	3.17 (88)	D-Cha	-	-	3-Amphac	Lys	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	D-sgLYs	0,0141	0,519
C-106	2196	7ZVV	3.17 (88)	D-Cha	-	-	3-Amphac	Phe(4-CH ₂ NH ₂)	D-sgLYs	0,0339	0,907	
C-107	2194	/	3.17 (88)	D-Cha	-	-	3-Amphac	Phe	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	D-sgLYs	0,254	2,23
C-108	2193	/	3.17 (88)	D-Cha	-	-	3-Amphac	2-Nal	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	D-sgLYs	0,259	1,78
C-109	2181	/	3.17 (88)	D-Cha	-	-	3-Amphac	Trp	Phe(3-CONH ₂)	D-sgLYs	IC ₅₀ = 25,8	IC ₅₀ = 45,5
C-110	2190	/	3.18 (89)	D-Cha	-	β-Ala	D-Cha	Lys	Lys	D-sgLYs	0,00428	0,993

Anhang

Nr.	MI	PDB	Zu finden in Tab. (S.)	Pw	P6	P5	P4	P3	P2	P1	K _i [μM]	
											ZIKV-Pro.	WNV-Pro.
C-111	2176	/	3.18 (89)	D-hCha	-	β-Ala	D-Cha	Lys	Lys	D-sgLys	0,00637	0,843
C-112	2187	/	3.18 (89)	D-hPhe	-	β-Ala	D-Cha	Lys	Lys	D-sgLys	0,0125	0,983
C-113	2184	/	3.18 (89)	D-Cha	-	β-Ala	D-Cha	Lys	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	D-sgLys	0,145	0,803
C-114	2183	/	3.18 (89)	D-Cha	-	β-Ala	D-Cha	Lys	Phe(3-CONH ₂)	D-sgLys	IC ₅₀ = 27,3	IC ₅₀ = 82,5
C-115	2182	/	3.18 (89)	D-Cha	-	β-Ala	D-Cha	Phe	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	D-sgLys	0,245	6,22
C-116	2180	/	3.18 (89)	D-Cha	-	β-Ala	D-Cha	Phe	Phe(3-CONH ₂)	D-sgLys	IC ₅₀ = 2,14	IC ₅₀ = 1,48
C-117	2286	/	3.20 (93)	Gly	-	Gly	β ² -hPhe ^a	2-Nal	Lys	D-sgLys	1,80	63,1
C-118	2287	/	3.20 (93)	Gly	-	Gly	β ² -hPhe ^a	2-Nal	Lys	D-sgLys	IC ₅₀ = 15,1	104
C-119	2159	/	3.22 (101)	D-hCha	-	-	3-Amphac	Arg	Arg	D-sgLys	IC ₅₀ = 0,711	IC ₅₀ = 4,72
C-120	2156	/	3.22 (101)	Phe	-	2-Nal	Arg	Arg	Arg	D-sgLys	IC ₅₀ = 0,310	IC ₅₀ = 1,81
C-121	2158	/	3.22 (101)	D-Phe	-	2-Nal	Arg	Arg	Arg	D-sgLys	IC ₅₀ = 0,380	IC ₅₀ = 12,4
C-122	2157	/	3.22 (101)	D-hCha	-	2-Nal	Arg	Arg	Arg	D-sgLys	IC ₅₀ = 0,750	IC ₅₀ = 2,67
C-123	2155	/	3.22 (101)	D-Phe	-	Phe	Arg	Arg	Arg	D-sgLys	IC ₅₀ = 0,685	IC ₅₀ = 42,5
C-124	2154	/	3.23 (101)	D-hCha	-	Lys	Cha	Lys	Cha	D-sgLys	IC ₅₀ = 32,8	IC ₅₀ = 131
C-125	2153	/	3.23 (101)	D-hCha	-	Arg	Cha	Lys	Cha	D-sgLys	IC ₅₀ = 16,1	IC ₅₀ = 67,1
C-126	2152	/	3.23 (101)	D-hCha	-	Lys	Phe	Lys	Cha	D-sgLys	IC ₅₀ = 52,2	IC ₅₀ = 196
C-127	2151	/	3.23 (101)	D-hCha	-	Arg	Phe	hArg	Cha	D-sgLys	IC ₅₀ = 10,6	IC ₅₀ = 295
C-128	2150	/	3.23 (101)	D-hCha	-	D-Arg	Phe	hArg	Cha	D-sgLys	IC ₅₀ = 11,6	IC ₅₀ = 39,9
C-129	2122	/	3.24 (105)	Sar	-	Gly	β-Ala	Lys	Lys	D-sgLys	0,332	30,5
C-130	2121	/	3.24 (105)	Gly	-	Sar	β-Ala	Lys	Lys	D-sgLys	0,333	30,6
C-131	2129	/	3.24 (105)	Gly	-	Gly	N-Me-β-Ala	Lys	Lys	D-sgLys	0,396	31,3
C-132	2120	/	3.24 (105)	Sar	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	D-sgLys	0,0623	6,13
C-133	2123	/	3.24 (105)	Gly	-	-	3-Amphac	N _α -Me-Lys	Lys	D-sgLys	0,00637	0,373
C-134	2124	/	3.24 (105)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	N _α -Me-Lys	D-sgLys	0,490	36,9
L-1	2217	/	3.4 (54)	H-Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	D-sgLys-NH ₂	0,0136	1,55
L-2	2223	7ZLD	3.4 (54)	Ac	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	D-sgLys-NH ₂	0,00948	1,48
L-3	2224	7ZLC	3.4 (54)	Ac	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	hAgm	0,0882	4,94
L-4	2173	/	3.29 (119)	D-gAla	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	Leu-OH	37,1	630
L-5	2172	/	3.29 (119)	D-gAla	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	Leu-NH ₂	0,275	163
L-6	2171	/	3.29 (119)	D-gAla	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	NH-iPe	1,64	57,2

7.8 Inhibitoren nach MI-Nummer

Tabelle 7.2 Inhibitoren nach MI-Nummer. Die Inhibitoren **MI-759** bis **MI-2116** wurden nicht im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und sind nur der Vollständigkeit halber aufgeführt. Die Inhibitoren **MI-2120** bis **MI-2138** wurden von L.C. SCHMACKE im Rahmen ihrer Masterarbeit auf Anregung des Verfassers hergestellt. Sofern eine Kristallstruktur im Komplex mit der ZIKV-Protease existiert, so ist der zugehörige PDB-Code angegeben. Ein „g“ vor der Aminosäureabkürzung symbolisiert einen glynylierten *N*-Terminus, ein „s“ eine Verknüpfung der P1-Seitenkette mit dem C-Terminus des P2-Rests, ein „u“ eine Harnstoffgruppe anstelle einer Aminogruppe am *N*-Terminus.

MI	Nr.	PDB	Zu finden in Tab. (S.)	P ω	P6	P5	P4	P3	P2	P1	K _i [μ M]	
											ZIKV-Pro.	WNV-Pro.
759	47	/	3.2 (47)	3-Amphac	-	-	-	Lys	Lys	D-sgLys	0,0373	15,3
1239	43	/	3.1 (45)	γ -Abu	-	-	4-Amphac	Lys	Lys	sgOrn	0,846	27,8
1240	38	6KK2	3.1 (45)	γ -Abu	-	-	4-Amphac	Lys	Lys	sgLys	0,0918	6,30
2106	45	/	3.1 (45)	γ -Abu	-	-	4-Amphac	Lys	Lys	D-sLys	24,7	68,1
2107	46	/	3.1 (45)	γ -Abu	-	-	4-Amphac	Lys	Lys	D-sOrn	13,2	31,7
2108	39	6KK3	3.1 (45)	γ -Abu	-	-	4-Amphac	Lys	Lys	D-sgLys	0,0701	4,97
2109	44	/	3.1 (45)	γ -Abu	-	-	4-Amphac	Lys	Lys	D-sgOrn	3,61	22,0
2110	42	6Y3B	3.2 (47)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	D-sgLys	0,00168	0,149
2111	41	6KK4	3.2 (47)	β -Ala	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	D-sgLys	0,00388	0,374
2112	40	6KPQ	3.2 (47)	γ -Abu	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	D-sgLys	0,00433	0,702
2113	54	7ZMI	3.4 (54)	H-Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	D-sgLys-OH	2,04	51,6
2114	48	/	3.2 (47)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	D-sgLys	1,42	47,6
2115	55	6KK5	3.5 (57)	Ala	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	D-sgLys	0,0182	1,39
2116	56	6KK6	3.5 (57)	D-Ala	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	D-sgLys	0,00352	0,237
2120	C-132	/	3.24 (105)	Sar	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	D-sgLys	0,0623	6,13
2121	C-130	/	3.24 (105)	Gly	-	Sar	β -Ala	Lys	Lys	D-sgLys	0,333	30,6
2122	C-129	/	3.24 (105)	Sar	-	Gly	β -Ala	Lys	Lys	D-sgLys	0,332	30,5
2123	C-133	/	3.24 (105)	Gly	-	-	3-Amphac	N _α -Me-Lys	Lys	D-sgLys	0,00637	0,373
2124	C-134	/	3.24 (105)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	N _α -Me-Lys	D-sgLys	0,490	36,9
2128	C-103	7ZTM	3.17 (88)	D-Cha	-	-	3-Amphac	2-Nal	Lys	D-sgLys	0,148	8,96
2129	C-131	/	3.24 (105)	Gly	-	Gly	N-Me- β -Ala	Lys	Lys	D-sgLys	0,396	31,3
2130	C-102	7ZUM	3.17 (88)	D-Cha	-	-	3-Amphac	Trp	Lys	D-sgLys	0,299	2,97
2131	C-64	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	hPhe	Lys	D-sgLys	0,442	3,85
2132	C-57	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Tyr	Lys	D-sgLys	0,197	3,75
2133	C-104	/	3.17 (88)	D-Cha	-	-	3-Amphac	N-Me-2-Nal	Lys	D-sgLys	0,435	7,94
2134	C-66	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	1-Nal	Lys	D-sgLys	0,266	3,15
2135	C-78	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Tyr	D-sgLys	18,2	422
2137	49	/	3.2 (47)	3-Amphac	-	-	Gly	Lys	Lys	D-sgLys	0,0412	1,76
2138	50	/	3.2 (47)	3-Amphac	-	-	β -Ala	Lys	Lys	D-sgLys	0,0814	56,5
2147	B-8	/	3.28 (118)	D-gAla	-	-	3-Amphac	Arg	Lys	Ble-OH	0,0508	3,67
2148	C-70	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Dab	D-sgLys	0,0129	0,689
2149	B-7	/	3.28 (118)	-	-	-	Phac	Lys	Lys	Ble-OH	0,845	5,44
2150	C-128	/	3.23 (101)	D-hCha	-	D-Arg	Phe	hArg	Cha	D-sgLys	IC ₅₀ = 11,6	IC ₅₀ = 39,9
2151	C-127	/	3.23 (101)	D-hCha	-	Arg	Phe	hArg	Cha	D-sgLys	IC ₅₀ = 10,6	IC ₅₀ = 295
2152	C-126	/	3.23 (101)	D-hCha	-	Lys	Phe	Lys	Cha	D-sgLys	IC ₅₀ = 52,2	IC ₅₀ = 196
2153	C-125	/	3.23 (101)	D-hCha	-	Arg	Cha	Lys	Cha	D-sgLys	IC ₅₀ = 16,1	IC ₅₀ = 67,1
2154	C-124	/	3.23 (101)	D-hCha	-	Lys	Cha	Lys	Cha	D-sgLys	IC ₅₀ = 32,8	IC ₅₀ = 131
2155	C-123	/	3.22 (101)	D-Phe	-	Phe	Arg	Arg	Arg	D-sgLys	IC ₅₀ = 0,685	IC ₅₀ = 42,5
2156	C-120	/	3.22 (101)	Phe	-	2-Nal	Arg	Arg	Arg	D-sgLys	IC ₅₀ = 0,310	IC ₅₀ = 1,81
2157	C-122	/	3.22 (101)	D-hCha	-	2-Nal	Arg	Arg	Arg	D-sgLys	IC ₅₀ = 0,750	IC ₅₀ = 2,67
2158	C-121	/	3.22 (101)	D-Phe	-	2-Nal	Arg	Arg	Arg	D-sgLys	IC ₅₀ = 0,380	IC ₅₀ = 12,4
2159	C-119	/	3.22 (101)	D-hCha	-	-	3-Amphac	Arg	Arg	D-sgLys	IC ₅₀ = 0,711	IC ₅₀ = 4,72
2160	C-31	/	3.8 (67)	Gly	Gly	Gly	D-Arg	Lys	Lys	D-sgLys	0,00862	1,22
2161	C-30	/	3.8 (67)	Gly	Gly	Gly	Arg	Lys	Lys	D-sgLys	0,0699	5,30
2162	C-25	7ZWK	3.8 (67)	Gly	Gly	Gly	D-Phe	Lys	Lys	D-sgLys	0,0144	1,74
2163	C-24	/	3.8 (67)	Gly	Gly	Gly	Phe	Lys	Lys	D-sgLys	0,315	5,93
2164	C-27	/	3.8 (67)	Gly	Gly	D-Phe	Gly	Lys	Lys	D-sgLys	0,204	3,43
2165	C-29	/	3.8 (67)	Gly	D-Phe	Gly	Gly	Lys	Lys	D-sgLys	0,0171	1,32
2166	C-28	/	3.8 (67)	Gly	Phe	Gly	Gly	Lys	Lys	D-sgLys	0,0399	2,04
2167	C-26	/	3.8 (67)	Gly	Gly	Phe	Gly	Lys	Lys	D-sgLys	0,145	3,32
2168	C-23	/	3.7 (66)	Gly	-	D-Phe	Gly	Lys	Lys	D-sgLys	0,0169	0,908
2169	C-22	/	3.7 (66)	Gly	-	Phe	Gly	Lys	Lys	D-sgLys	0,0576	4,07
2171	L-6	/	3.29 (119)	D-gAla	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	NH-iPe	1,64	57,2
2172	L-5	/	3.29 (119)	D-gAla	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	Leu-NH ₂	0,275	163
2173	L-4	/	3.29 (119)	D-gAla	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	Leu-OH	37,1	630
2174	C-82	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Phe(3-C(O)NH ₂)	D-sgLys	6,62	135
2175	C-61	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Phe(3-C(O)NH ₂)	Lys	D-sgLys	0,190	5,87
2176	C-111	/	3.18 (89)	D-hCha	-	β -Ala	D-Cha	Lys	Lys	D-sgLys	0,00637	0,843
2177	C-100	/	3.16 (86)	D-hCha	-	Gly	β -Ala	Lys	Lys	D-sgLys	0,0366	0,767
2178	C-81	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Phe(3-CN)	D-sgLys	6,92	124
2179	C-60	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Phe(3-CN)	Lys	D-sgLys	0,0725	3,04
2180	C-116	/	3.18 (89)	D-Cha	-	β -Ala	D-Cha	Phe	Phe(3-CONH ₂)	D-sgLys	IC ₅₀ = 2,14	IC ₅₀ = 1,48

Anhang

MI	Nr.	PDB	Zu finden in Tab. (S.)	P ω	P6	P5	P4	P3	P2	P1	K _i [μM]	
											ZIKV-Pro.	WNV-Pro.
2181	C-109	/	3.17 (88)	D-Cha	-	-	3-Amphac	Trp	Phe(3-CONH ₂)	D-sgLys	IC ₅₀ = 25,8	IC ₅₀ = 45,5
2182	C-115	/	3.18 (89)	D-Cha	-	β-Ala	D-Cha	Phe	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	D-sgLys	0,245	6,22
2183	C-114	/	3.18 (89)	D-Cha	-	β-Ala	D-Cha	Lys	Phe(3-CONH ₂)	D-sgLys	IC ₅₀ = 27,3	IC ₅₀ = 82,5
2184	C-113	/	3.18 (89)	D-Cha	-	β-Ala	D-Cha	Lys	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	D-sgLys	0,145	0,803
2185	C-88	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Cha	D-sgLys	7,83	50,4
2186	C-67	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Cha	Lys	D-sgLys	0,0407	1,61
2187	C-112	/	3.18 (89)	D-hPhe	-	β-Ala	D-Cha	Lys	Lys	D-sgLys	0,0125	0,983
2188	C-101	/	3.16 (86)	D-hPhe	-	Gly	β-Ala	Lys	Lys	D-sgLys	0,0850	1,81
2189	C-99	/	3.16 (86)	D-Cha	-	Gly	β-Ala	Lys	Lys	D-sgLys	0,103	2,04
2190	C-110	/	3.18 (89)	D-Cha	-	β-Ala	D-Cha	Lys	Lys	D-sgLys	0,00428	0,993
2191	C-8	7PGC	3.5 (57)	D-hCha	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	D-sgLys	0,00233	0,219
2192	C-10	/	3.5 (57)	D-hPhe	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	D-sgLys	0,00602	0,331
2193	C-108	/	3.17 (88)	D-Cha	-	-	3-Amphac	2-Nal	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	D-sgLys	0,259	1,78
2194	C-107	/	3.17 (88)	D-Cha	-	-	3-Amphac	Phe	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	D-sgLys	0,254	2,23
2195	C-105	ZZV4	3.17 (88)	D-Cha	-	-	3-Amphac	Lys	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	D-sgLys	0,0141	0,519
2196	C-106	ZZVV	3.17 (88)	D-Cha	-	-	3-Amphac	Phe(4-CH ₂ NH ₂)	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	D-sgLys	0,0339	0,907
2197	C-19	/	3.7 (66)	Gly	-	Gly	D-Ala	Lys	Lys	D-sgLys	0,187	6,97
2198	C-18	/	3.7 (66)	Gly	-	Gly	Ala	Lys	Lys	D-sgLys	0,0922	1,17
2199	C-21	/	3.7 (66)	Gly	-	Gly	D-Phe	Lys	Lys	D-sgLys	0,139	17,3
2200	C-92	/	3.14 (85)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	D-sLys	22,6	98,9
2201	C-4	7VLG	3.5 (57)	D-Val	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	D-sgLys	0,00774	0,439
2202	C-2	/	3.2 (47)	β-Ala	-	-	3-Aphac	Lys	Lys	D-sgLys	0,0802	4,28
2203	C-11	/	3.6 (62)	Gly	-	-	ε-Aca	Lys	Lys	D-sgLys	0,0154	0,973
2204	C-12	/	3.6 (62)	Gly	-	-	δ-Ava	Lys	Lys	D-sgLys	0,0167	1,22
2205	C-62	ZZQ1	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Trp	Lys	D-sgLys	0,0344	0,678
2206	C-58	ZZQF	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Tyr(3-NH ₂)	Lys	D-sgLys	0,187	2,13
2207	C-79	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Tyr(3-NH ₂)	D-sgLys	3,71	77,9
2208	C-93	/	3.14 (85)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	D-suLys	11,7	67,7
2210	C-59	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Tyr(3-NH ₂ , O-C(NH)NH ₂)	Lys	D-sgLys	0,192	4,72
2211	C-80	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Tyr(3-NH ₂ ,O- C(NH)NH ₂)	D-sgLys	0,697	57,1
2212	C-13	/	3.6 (62)	Gly	-	-	γ-Abu	Lys	Lys	D-sgLys	0,124	6,70
2213	C-49	/	3.11 (75)	β-Ala	-	-	-	Lys	Lys	D-sgLys	7,91	91,8
2214	C-48	/	3.11 (75)	γ-Abu	-	-	-	Lys	Lys	D-sgLys	11,0	116
2215	C-47	/	3.11 (75)	δ-Ava	-	-	-	Lys	Lys	D-sgLys	9,24	239
2216	C-46	/	3.11 (75)	ε-Aca	-	-	-	Lys	Lys	D-sgLys	1,48	63,3
2217	L-1	/	3.4 (54)	H-Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	D-sgLys-NH ₂	0,0136	1,55
2218	C-5	/	3.5 (57)	D-Pro	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	D-sgLys	0,0177	0,850
2219	C-16	7VLI	3.6 (62)	Gly	-	Gly	Gly	Lys	Lys	D-sgLys	0,00374	0,129
2220	C-14	7VLH	3.6 (62)	Gly	-	Gly	β-Ala	Lys	Lys	D-sgLys	0,00172	0,0686
2221	C-15	7PG1	3.6 (62)	Gly	-	β-Ala	Gly	Lys	Lys	D-sgLys	0,00735	0,468
2222	C-17	/	3.6 (62)	β-Ala	-	Gly	Gly	Lys	Lys	D-sgLys	0,0128	0,974
2223	L-2	ZZLD	3.4 (54)	Ac	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	D-sgLys-NH ₂	0,00948	1,48
2224	L-3	ZZLC	3.4 (54)	Ac	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	hAgm	0,0882	4,94
2225	C-3	/	3.5 (57)	Val	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	D-sgLys	0,0428	6,71
2226	C-1	/	3.2 (47)	γ-Abu	-	-	3-Aphac	Lys	Lys	D-sgLys	0,106	16,5
2227	C-89	ZZYS	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Nle	D-sgLys	12,4	99,1
2228	C-68	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Nle	Lys	D-sgLys	0,0735	1,27
2229	C-86	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	2-Nal	D-sgLys	3,06	101
2230	C-65	8A15	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	2-Nal	Lys	D-sgLys	0,0481	5,09
2231	C-35	7O55	3.9 (68)	Gly	-	β-Ala	D-Ala	Lys	Lys	D-sgLys	0,00562	1,43
2232	C-36	/	3.9 (68)	Gly	-	β-Ala	D-Val	Lys	Lys	D-sgLys	0,00826	1,68
2233	C-37	/	3.9 (68)	Gly	-	β-Ala	D-Leu	Lys	Lys	D-sgLys	0,00430	1,03
2234	C-98	/	3.15 (86)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Trp	-	231	> 500
2235	C-76	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Cit	D-sgLys	2,44	75,3
2236	C-55	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Cit	Lys	D-sgLys	0,0525	0,824
2237	C-84	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Phe	D-sgLys	8,68	99,7
2238	C-63	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Phe	Lys	D-sgLys	0,0593	1,53
2239	C-69	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Ala	Lys	D-sgLys	0,0469	0,714
2240	C-32	/	3.9 (68)	Gly	-	β-Ala	Ala	Lys	Lys	D-sgLys	0,075	7,76
2241	C-33	7PFY	3.9 (68)	Gly	-	β-Ala	Val	Lys	Lys	D-sgLys	0,340	39,7
2242	C-34	/	3.9 (68)	Gly	-	β-Ala	Leu	Lys	Lys	D-sgLys	0,124	10,3
2243	C-96	/	3.15 (86)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Orn	-	35,5	> 500
2244	C-94	/	3.15 (86)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	-	29,2	> 500
2245	C-97	/	3.15 (86)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Arg	-	34,1	> 500
2246	C-40	/	3.9 (68)	Gly	-	β-Ala	D-Pro	Lys	Lys	D-sgLys	0,0210	2,59
2247	C-38	7PFQ	3.9 (68)	Gly	-	β-Ala	D-Nle	Lys	Lys	D-sgLys	0,00494	0,892
2248	C-42	7OBV	3.9 (68)	Gly	-	β-Ala	D-Phe	Lys	Lys	D-sgLys	0,00306	1,92
2249	C-43	/	3.9 (68)	Gly	-	β-Ala	D-hPhe	Lys	Lys	D-sgLys	0,0103	1,29
2250	C-95	/	3.15 (86)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	hArg	-	56,9	> 500
2251	C-91	/	3.14 (85)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	sgLys	0,0450	9,98
2252	C-72	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Arg	D-sgLys	0,0112	0,898
2253	C-75	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Gln	D-sgLys	1,97	27,6

7.8 Inhibitoren nach MI-Nummer

MI	Nr.	PDB	Zu finden in Tab. (S.)	Pw	P6	P5	P4	P3	P2	P1	K _i [μM]	
											ZIKV-Pro.	WNV-Pro.
2254	C-51	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Arg	Lys	D-sgLys	0,00334	0,209
2255	C-90	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Ala	D-sgLys	52,5	342
2257	C-83	8AQB	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Trp	D-sgLys	2,79	69,5
2258	C-71	8AQK	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	nArg	D-sgLys	0,0395	0,803
2259	C-50	7ZW5	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	nArg	Lys	D-sgLys	0,00225	0,141
2260	C-56	8AQA	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Nle(ε-OH)	Lys	D-sgLys	0,0331	0,905
2262	C-77	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Nle(ε-OH)	D-sgLys	2,64	121
2263	C-41	/	3.9 (68)	Gly	-	β-Ala	D-Phe	Lys	Lys	D-sgLys	0,00484	0,371
2264	C-39	/	3.9 (68)	Gly	-	β-Ala	D-Cha	Lys	Lys	D-sgLys	0,00694	0,735
2266	C-9	/	3.5 (57)	D-Phe	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	D-sgLys	0,00534	0,693
2267	C-7	7PFZ	3.5 (57)	D-Cha	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	D-sgLys	0,00359	0,395
2268	B-3	/	3.28 (118)	gGly	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	Ble-OH	0,0114	4,01
2269	B-4	/	3.28 (118)	gAla	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	Ble-OH	0,0114	3,63
2270	B-5	7ZNO	3.28 (118)	D-gAla	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	Ble-OH	0,00796	3,82
2271	B-6	/	3.28 (118)	gβ-Ala	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	Ble-OH	0,0184	0,838
2273	B-2	/	3.28 (118)	H-Gly	-	Gly	3-Amphac	Lys	Lys	Ble-OH	0,294	11,7
2275	B-1	/	3.28 (118)	gGly	-	Gly	3-Amphac	Lys	Lys	Ble-OH	0,0315	2,73
2286	C-117	/	3.20 (93)	Gly	-	Gly	β ² -hPhe ^a	2-Nal	Lys	D-sgLys	1,80	63,1
2287	C-118	/	3.20 (93)	Gly	-	Gly	β ² -hPhe ^a	2-Nal	Lys	D-sgLys	IC ₅₀ = 15,1	104
2288	C-45	/	3.10 (73)	Gly	-	Gly	β ² -hPhe	Lys	Lys	D-sgLys	0,0860	6,49
2289	C-44	7O2M	3.10 (73)	Gly	-	Gly	D-β ² -hPhe	Lys	Lys	D-sgLys	0,0630	14,8
2290	C-87	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	1-Nal	D-sgLys	20,3	95,5
2291	C-85	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	hPhe	D-sgLys	39,2	> 500
2292	C-54	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Gln	Lys	D-sgLys	0,0524	0,742
2293	C-73	7ZPD	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	D-sgLys	0,00269	0,183
2294	C-52	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Phe(3-CH ₂ NH ₂)	Lys	D-sgLys	0,0454	1,36
2295	C-6	7OC2	3.5 (57)	D-Leu	-	-	3-Amphac	Lys	Lys	D-sgLys	0,00953	0,276
2297	C-74	/	3.13 (81)	Gly	-	-	3-Amphac	Lys	Phe(4-CH ₂ NH ₂)	D-sgLys	0,0115	0,852
2298	C-53	/	3.12 (77)	Gly	-	-	3-Amphac	Phe(4-CH ₂ NH ₂)	Lys	D-sgLys	0,0178	0,964
2299	C-20	/	3.7 (66)	Gly	-	Gly	Phe	Lys	Lys	D-sgLys	0,0319	0,657

7.9 Tabellarischer Lebenslauf

Entfällt aus Datenschutzgründen in dieser digitalen Version.

7.10 Danksagung

Entfällt aus Datenschutzgründen in dieser digitalen Version.

7.11 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Über die Hemmung des Flavivirins: Makrocyclische Peptidderivate als Inhibitoren der NS2B-NS3-Protease des Zika-Virus und des West-Nil-Virus“

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

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

Marburg, den 1. November 2022

Niklas Josua Braun

