

Selektive aktivitätsbasierte Sonden für Cystein-Cathepsine**

Anja Watzke, Gregor Kosec, Maik Kindermann, Volker Jeske, Hans-Peter Nestler, Vito Turk, Boris Turk* und K. Ulrich Wendt*

Proteasen sind an einer Vielzahl lebenswichtiger Prozesse beteiligt und sind essenzielle Komponenten der Signaltransduktion und der Gewebe-Homöostase.^[1-3] Um ihre proteolytische Aktivität unter stringenter Kontrolle zu halten, werden die meisten Proteasen *in vivo* als inaktive Vorstufenproteine – so genannte Zymogene – synthetisiert, die im Bedarfsfall durch limitierte Proteolyse aktiviert werden. Dieser Regulationsmechanismus erschwert es, mit klassischen biochemischen oder proteomischen Methoden *in vivo* zwischen dem Expressionsgrad und der proteolytischen Aktivität einer Protease zu unterscheiden. Aus diesem Grund hat die Entwicklung chemischer Sonden, die anstelle der Expression mithilfe biomolekularer Bildgebung direkt die Aktivität einer Protease visualisieren, in den letzten Jahren beträchtliches Interesse gewonnen. Für Proteasen wurde eine Reihe aktivitätsbasierter Sonden (activity-based probes; ABPs) mit intern gelöschter Fluoreszenz beschrieben, die durch proteolytische Spaltung fluoreszent werden.^[4,5]

Für die Analyse der Funktion einzelner Proteasen in der komplexen Umgebung der lebenden Zelle ist es notwendig, selektive und zellgängige ABPs zu entwickeln, was bisher eine schwierige Aufgabe war. ABPs für proteolytische Enzyme wurden bisher meist aus Peptidsubstraten abgeleitet, die mit geeigneten Reportergruppen gekuppelt werden, sodass die proteolytische Spaltung der Substratsequenz dieser Sonden zur räumlichen Trennung von Fluorophor und Löschern führt.^[4] Bevorzugte Substratsequenzen wurden meist aus kombinatorischen Bibliotheken über Positionsabtastung (positional scanning) identifiziert.^[6] Synthese und Screening

solcher Bibliotheken sind jedoch zeitintensiv, und die peptidische Natur der resultierenden Substrate kann zur unspezifischen Spaltung durch andere Proteasen führen, wenn die resultierenden Sonden für bildgebende Experimente in Zellen oder In-vivo-Modellen verwendet werden. Für Proteasen der Cystein-Cathepsin-Familie sind zellgängige ABPs als Suizidsubstrate entworfen worden, die das Enzym kovalent modifizieren und dadurch inaktivieren.^[5,7] Solche ABPs sind leistungsfähige Werkzeuge für die Lokalisierung von Proteasen. Für die hochempfindliche In-vivo-Beobachtung der Aktivität und Inhibition von Proteasen wären jedoch ABPs, die Enzymsubstrate sind und das Fluoreszenzsignal bei der Proteolyse verstärken, voraussichtlich erheblich besser geeignet. Solche ABPs sind von hohem Interesse für die Arzneimittelforschung und Diagnostik, da sie es ermöglichen könnten, die Wirkung von Inhibitoren durch Kompetitionsstudien direkt in pharmakologisch relevanten Modellen zu beobachten.^[4]

Wir stellen hier ein neues Konzept zum Design selektiver, stabiler und zellgängiger ABPs vor. Die beschriebenen Sonden sind Substrate für die Zielenzyme und unterscheiden selektiv zwischen verwandten Proteasen aus der Cystein-Cathepsin-Familie. Cystein-Cathepsine sind etablierte pharmazeutische Angriffspunkte für die Behandlung von Knochen- und degenerativen Gelenkerkrankungen (Cathepsin K)^[8,9] sowie von Störungen des Immunsystems (Cathepsin S).^[10,11] Das Design unserer ABPs beruht nicht auf Peptidsubstraten, die aus kombinatorischen Bibliotheken durch Positionsabtastung gewonnen werden. Wir haben dem Design der ABPs vielmehr die Strukturen von hochpotenten und selektiven Cathepsinhibitoren zugrunde gelegt, die umfangreiche medizinalchemische Optimierungsprogramme durchlaufen haben und folglich vorteilhafte pharmakokinetische Eigenschaften zusätzlich zur Hemmstärke und zur Selektivität gegen verwandte Proteasen aufweisen.^[1,11-14] Diese Inhibitoren enthalten meist eine reaktive Gruppe – häufig ein Nitril – als elektrophiles Mimetikum der spaltbaren Bindung im Substrat. Bei der Bindung an ein Cathepsin wird diese elektrophile Gruppe vom katalytischen Cystein des Enzyms angegriffen, wobei ein kovalenter Enzym-Inhibitor-Komplex entsteht.^[11-14] Da der Enzymmechanismus innerhalb der Familie der Cystein-Cathepsine konserviert ist, muss die Selektivität solcher Inhibitoren durch ihr chemisches Gerüst determiniert werden. Wir nahmen daher an, dass der Austausch der elektrophilen Gruppe des Inhibitors durch eine spaltbare Peptidbindung ein Enzymsubstrat (anstatt eines Suizidinhibitors) ergeben würde, dessen Selektivitätsprofil auf der Spezifität des ursprünglichen Inhibitors beruht. Derivatisierung mit passenden Reportergruppen sollte zu selektiven ABPs für Cystein-Cathepsine führen (Schema 1).

[*] Dr. G. Kosec, [+] Prof. V. Turk, Prof. B. Turk

Jožef Stefan Institute

Department of Biochemistry and Molecular Biology

Jamova 39, 1000 Ljubljana (Slowenien)

Fax: (+ 386) 1477-3984

E-Mail: Boris.Turk@ijs.si

Dr. A. Watzke, [+] Dr. M. Kindermann, V. Jeske, Dr. H.-P. Nestler,

Dr. K. U. Wendt

Sanofi-Aventis Deutschland GmbH

SMA Chemical and Analytical Sciences

Industriepark Park Höchst, 65926 Frankfurt (Deutschland)

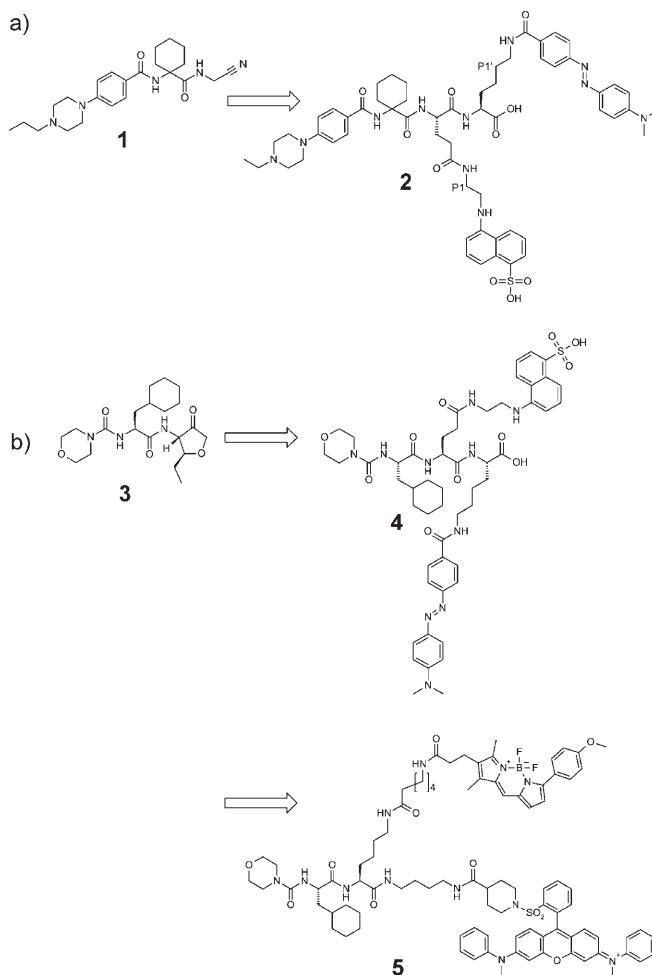
Fax: (+ 49) 693-051-6189

E-Mail: ulrich.wendt@sanofi-aventis.com

[†] Diese Autoren haben in gleichem Maße zur Arbeit beigetragen.

[**] Diese Arbeit wurde durch das VI. Rahmenprogramm der EU Kommission unterstützt (Projekt CAMP, LSHG-2006-018830). Wir danken Prof. Markus Grüter und Dr. Marc Nazaré für hilfreiche Kommentare zu dieser Arbeit.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.



Schema 1. Umwandlung von Cathepsin-Inhibitoren in ABPs. a) Selektiver Cathepsin-K-Inhibitor **1**^[13] und abgeleitete ABP **2**. In **2** ist die elektrophile Nitrilgruppe gegen eine Peptidbindung ausgetauscht. Fluorophor 5-[2-Aminoethyl]amino)naphthalin-1-sulfonsäure und Löscher 4-[4-(Dimethylamino)phenyl]azo)benzoësäure liegen in den Positionen P1 und P1' des Inhibitorgestüts. b) Selektiver Cathepsin-S-Inhibitor **3**^[11] und entsprechende ABP **4**. Die Anordnung von Fluorophor und Löscher ist analog zu der in **1**. ABP **5** entspricht ABP **4**, ist aber mit dem rotverschobenen Fluorophor/Löscher-Paar Bodipy TMR-X und QSY-7 ausgestattet und daher für In-vivo-Experimente geeignet.

Das Konzept, ABPs aus den Strukturen optimierter Inhibitoren anstatt aus Peptidsubstraten herzuleiten, sollte daher eine breite Basis vorhandener Struktur-Aktivitäts-Beziehungen für das Design neuer spezifischer ABPs zugänglich machen.

Mehrere selektive Cathepsin-K-Inhibitoren sind in klinischen Studien untersucht worden.^[13] Um die Tragfähigkeit unseres Konzepts zu demonstrieren, wählten wir aus diesen Molekülen den Nitrilinhibitor **1** als Grundstruktur einer ABP für Cathepsin K aus (Schema 1 a). Verbindung **1** hat eine hohe Affinität zu Cathepsin K ($IC_{50} = 0.5$ nM) und zeigt gute Selektivität gegen die verwandten Cathepsine B ($IC_{50} = 6200$ nM) und S ($IC_{50} = 2200$ nM).^[13] **3** wurde als spezifischer Cathepsin-S-Inhibitor beschrieben und wurde folglich als vielversprechender Startpunkt einer ABP für Cathepsin S ausgewählt (Schema 1 b).^[11]

Für die Synthese der gewünschten ABPs für Cathepsin K und S ließen wir die Gerüststrukturen der Inhibitoren **1** und **3** unverändert. Die elektrophilen Nitrilgruppen wurden in spaltbare Peptidbindungen umgewandelt (Schema 1). Kokrystallstrukturen von Cathepsin-K- und Cathepsin-S-Inhibitoren zeigen, dass die P1- und P1'-Gruppen dem umgebenden Lösungsmittel zugänglich sind.^[15] Daher war es naheliegend, die sterisch anspruchsvollen Fluorophor- und Löschergruppen in diesen Positionen anzubringen. Die spaltbare Peptidbindung liegt zwischen der mit dem Fluorophor modifizierten Glutaminsäure in P1 und dem löschermodifizierten Lysin in P1' und sollte somit genau so in der Bindungstasche orientiert sein, dass eine Spaltung durch Cathepsin K (Sonde **2**) oder Cathepsin S (Sonde **4**) möglich ist. Die Verbindungen **2** und **4** wurden durch Festphasensynthese hergestellt.^[16]

Während Cathepsin K ins extrazelluläre Medium transportiert werden kann,^[10] ist Cathepsin S überwiegend in Lysosomen lokalisiert, wo es für die Antigen-Prozessierung und -Präsentation relevant ist.^[10-11] Die Bildgebung der Aktivität von Cathepsin S in vivo erfordert folglich zellgängige Sonden, deren spektroskopische Eigenschaften mit Zell-Imaging kompatibel sind. Um diesen Anforderungen zu genügen, wurde durch Austausch des Fluorophor/Löscher-Paares aus ABP **4** gegen Bodipy TMR-X und QSY-7 die im langwelligen Bereich fluoreszierende Sonde **5** über eine Kombination von Fest- und Lösungssphasenchemie synthetisiert.^[16]

Der enzymatische Umsatz und die Selektivität von **2** und **4** wurden zunächst *in vitro* mit den verwandten Cystein-Cathepsinen S, K, B und L untersucht.^[17] ABP **2** wurde selektiv durch Cathepsin K gespalten (Abbildung 1 a) und zeigte innerhalb der Nachweisgrenze der Messung absolute Selektivität gegen Cathepsin S. Entsprechend wurde **4** durch die Cathepsine S und L gespalten, während unter den gewählten Bedingungen keine Zunahme der Fluoreszenz mit den verwandten Cathepsinen K und B auftrat (Abbildung 1 b). Diese Beobachtung spiegelt für beide ABPs die Selektivität der Inhibitoren wider, aus denen sich die Sonden strukturell herleiten.^[11] Beide ABPs sind in menschlichem Plasma stabil, und ihre enzymatischen Umsatzzahlen sind mit denen bekannter Proteasesubstrate vergleichbar (Tabelle 1). Entsprechend den Affinitäten der zugrunde liegenden Inhibitoren **1** und **3** weisen **2** und **4** niedrige K_M -Werte von 35 bzw. 1.3 μ M für ihre Zielenzyme Cathepsin K bzw. S auf.

ABP **5** trägt ein Fluorophor/Löscher-Paar, das durch seine spektroskopischen Eigenschaften für Zell-Imaging geeignet ist. HaCaT-Zellen (spontan immortalisierte humane Keratinozyten) wurden mit einer 8 μ M Lösung von **5** inkubiert. In Übereinstimmung mit der berichteten lysosomalen Expression von Cathepsin S und L in dieser Zelllinie^[18] beobachteten wir, dass sich die Fluoreszenz in einem Lysosomen-kompatiblen Muster anreicherte (Abbildung 2a). Vorinkubation der Zellen mit 15 μ M E64d, einem Breitband-Cathepsin-Inhibitor, oder mit 15 μ M eines Inhibitors, der für die Cathepsine S und L selektiv ist,^[19] resultierte in nahezu vollständiger Unterdrückung der Fluoreszenz (Abbildung 2b,c). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass das Fluoreszenzsignal ausschließlich auf der Aktivität von Cathepsin S und/oder Cathepsin L beruht. Ähnliche Resultate wurden mit huma-

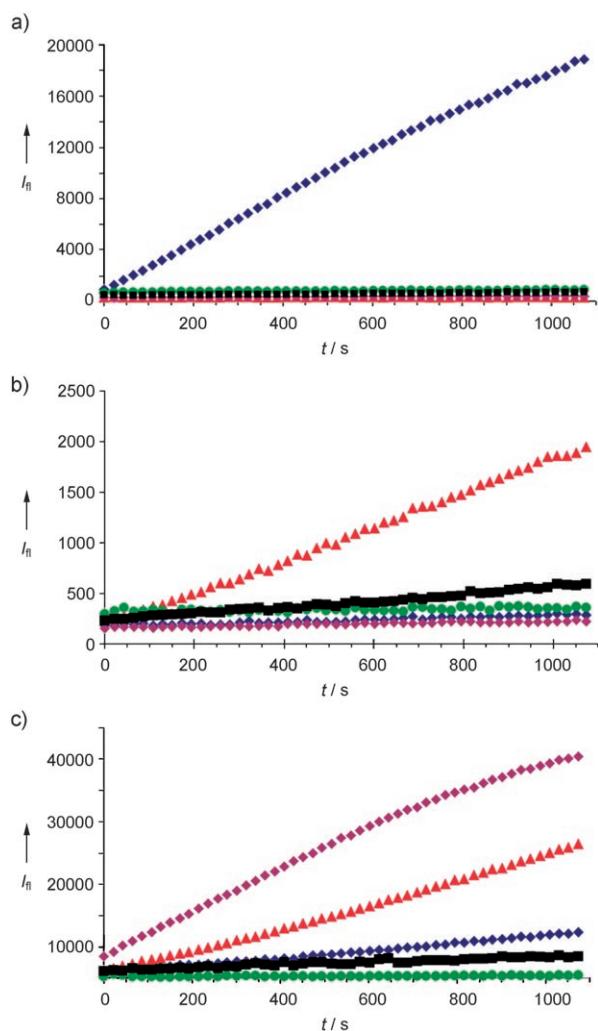


Abbildung 1. Enzymatische Umsetzung der ABPs **2**, **4** und **5** durch die Cystein-Cathepsine S (▲), K (◆), B (●), L (◆) sowie Papain (■); Konzentration jeweils 10 nm.^[17] a) Umsatz von **2** (Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 336$ nm, Emissionswellenlänge $\lambda_{\text{em}} = 468$ nm); b) Umsatz von **4** ($\lambda_{\text{ex}} = 336$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 468$ nm); c) Umsatz von **5** ($\lambda_{\text{ex}} = 544$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 573$ nm).

nen U937-Monocyten erhalten (Daten nicht gezeigt). Unsere Befunde zeigen, dass mit der Sonde **5**, die durch Umwandlung eines selektiven Cathepsin-Inhibitors in ein spaltbares Substrat erhalten wurde, die Aktivität von zwei Cystein-Cathepsinen in lebenden Zellen selektiv verfolgt werden kann.

Zusammenfassend zeigen die Fluoreszenzsonden **2**, **4** und **5**, dass wünschenswerte Eigenschaften von Suizidinhibitoren der Cystein-Cathepsine auf zellgängige und selektive ABPs transferiert werden können, wenn die elektrophile Gruppe des Inhibitors gegen eine spaltbare Peptidbindung ausgetauscht wird. Der Substratcharakter und die Zellpermeabilität der so erhaltenen ABPs ermöglichen es, die Aktivität ausgewählter Proteasen in lebenden Zellen zu verfolgen. Im Vergleich zur üblichen Vorgehensweise bei der Wirkstoffentwicklung, die auf die Umwandlung bevorzugter Proteasesubstrate in Inhibitoren und deren medizinalchemische Optimierung setzt, haben wir mit der Umwandlung von op-

Tabelle 1: Kinetische Parameter von **2**, **4** und **5** mit verschiedenen Cathepsinen.^{[17][a]}

	Cath S	Cath K	Cath B	Cath L	Papain
K_M [M]	2 n.d.	3.5×10^{-5}	8.8×10^{-4}	7.1×10^{-3}	6.3×10^{-6}
v_{max} [mmol s ⁻¹]	2 n.d.	7.3	2.6	9.7	0.04
k_{cat}/K_M [M ⁻¹ s ⁻¹]	2 n.d.	5420	283	424	296
K_M [M]	4 1.3×10^{-6}	8.9×10^{-5}	3.2×10^{-3}	8.4×10^{-4}	1.6×10^{-5}
v_{max} [mmol s ⁻¹]	4 0.5	0.6	2.7	19.2	0.1
k_{cat}/K_M [M ⁻¹ s ⁻¹]	4 15100	187	332	7070	581
K_M [M]	5 8.8×10^{-6}	5.6×10^{-4}	n.d.	3.5×10^{-6}	1.4×10^{-4}
v_{max} [mmol s ⁻¹]	5 0.35	3.3	n.d.	0.3	0.9
k_{cat}/K_M [M ⁻¹ s ⁻¹]	5 3930	569	n.d.	7940	680

[a] Kinetische Effizienz von **2**, **4** und **5**. **2** und **4** weisen gute Selektivität zwischen den verwandten Cysteincathepsinen S, K, B, L sowie Papain auf (n.d. = kein Umsatz nachweisbar). **5** ist selektiv für Cathepsin S und L. Alle Fehler sind kleiner 10%.

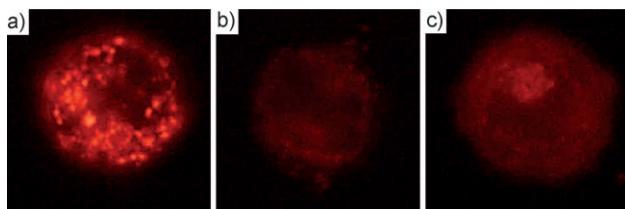


Abbildung 2. Fluoreszenzmikroskopische Detektion von Cathepsin-aktivität in HaCat-Zellen. a) Nach 3 h Inkubation von humanen Keratinozyten mit 8 μ M **5** entsteht ein Lysosomen-kompatibles Fluoreszenzmuster. b) Nach Präinkubation mit 15 μ M E64d wird keine signifikante Fluoreszenz beobachtet. c) Nach Präinkubation mit 15 μ M eines selektiven Cathepsin-S/L-Inhibitors^[19] wird keine signifikante Fluoreszenz beobachtet.

timierten Inhibitoren zu ABPs mit Substratcharakter den umgekehrten Weg beschritten. Dieses Konzept eines „reversen Designs“ überträgt optimierte Eigenschaften des zu grunde liegenden Inhibitoren auf die ABP und könnte so einen allgemeinen Weg zu selektiven Sonden für Cystein-Cathepsine und andere Cysteinproteasen eröffnen. „Reverses Design“ macht zudem ein umfangreiches Reservoir vorhandener Struktur-Aktivitäts-Beziehungen für die Entwicklung von neuen ABPs zugänglich. Mit diesem Ansatz sollten nicht nur die Selektivität, sondern auch die K_M -Werte der ABPs auf der Basis der Eigenschaften der zugrunde liegenden Inhibitoren einstellbar sein. Die niedrigen K_M -Werte von **2**, **4** und **5** machen diese Sonden interessant für In-vivo-Studien.

Eingegangen am 25. Juni 2007,
veränderte Fassung am 19. September 2007
Online veröffentlicht am 19. November 2007

Stichwörter: Enzyme · Fluoreszenzsonden · Inhibitoren · Medizinische Chemie

[1] B. Turk, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 785–799.

[2] X. S. Puente, L. M. Sanchez, C. M. Overall, C. Lopez-Otin, *Nat. Rev. Genet.* **2003**, *4*, 544–558.

- [3] O. Vasiljeva, T. Reinheckel, C. Peters, D. Turk, V. Turk, B. Turk, *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 385–401.
- [4] a) M. Fonovic, M. Bogyo, *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 253–261; b) J. Rao, A. Dragulescu-Andrasi, H. Yao, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18*, 17–25; c) L. Shi, V. De Paoli, N. Rosenzweig, Z. Rosenzweig, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10378–10379; d) R. Weissleder, C. H. Tung, U. Mahmood, A. Bogdanov, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 375–378; e) B. Law, A. Curino, T. H. Bugge, R. Weissleder, C. H. Tung, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 99–106; f) M. Rudin, R. Weissleder, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 123–131.
- [5] G. Blum, S. R. Mullins, K. Keren, M. Fonovic, C. Jedeszko, M. J. Rice, B. F. Sloane, M. Bogyo, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 203–209.
- [6] a) M. Meldal, *QSAR Comb. Sci.* **2005**, *24*, 1141–1148; b) B. J. Backes, J. L. Harris, F. Leonetti, C. S. Craik, J. A. Ellman, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 187–193; Y. Choe, F. Leonetti, D. C. Greenbaum, F. Lecaille, M. Bogyo, D. Brömmel, J. A. Ellman, C. S. Craik, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 12824–12832.
- [7] M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3279–3301.
- [8] P. Saftig, E. Hunziker, O. Wehmeyer, S. Jones, A. Boyde, W. Rommerkirch, J. D. Moritz, P. Schu, K. von Figura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 13453–13458.
- [9] V. Turk, B. Turk, D. Turk, *EMBO J.* **2001**, *20*, 4629–4633.
- [10] R. J. Riese, P. R. Wolf, D. Bromme, L. R. Natkin, J. A. Villadangos, H. L. Ploegh, H. A. Chapman, *Immunity* **1996**, *4*, 357–366.
- [11] J. Link, S. Zipfel, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2006**, *9*, 471–482.
- [12] J. C. Powers, J. L. Asgian, O. D. Ekici, K. E. James, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4639–4750.
- [13] U. B. Grabbowska, T. J. Chambers, M. Shiroo, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2005**, *8*, 619–630.
- [14] a) A. W. Patterson, W. J. L. Wood, M. Hornsby, S. Lesley, G. Spraggon, J. A. Ellman, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6298–6307; b) Y. D. Ward, D. S. Thomson, L. L. Frye, C. L. Cywin, T. Morwick, M. J. Emmanuel, R. Zidell, D. McNeil, Y. Bekkali, M. Giradot, M. Hrapchak, M. DeTuri, K. Crane, D. White, S. Pav, Y. Wang, M. H. Hao, C. A. Grygon, M. E. Labadia, D. M. Freeman, W. Davidson, J. L. Hopkins, M. L. Brown, D. M. Spero, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5471–5482; c) T. A. Pauly, T. Sulea, M. Ammirati, J. Sivaraman, D. E. Danley, M. C. Griffon, A. V. Kamath, I. K. Wang, E. R. Laird, A. P. Seddon, R. Menard, M. Cygler, V. L. Rath, *Biochemistry* **2003**, *42*, 3203–3213.
- [15] a) J. G. Catalano, D. N. Deaton, E. S. Furfine, A. M. Hassell, R. B. McFadyen, A. B. Miller, L. R. Miller, L. M. Shewchuk, D. H. Willard, L. L. Wright, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 275–278; b) D. G. Barrett, D. N. Deaton, A. M. Hassell, R. B. McFadyen, A. B. Miller, L. R. Miller, J. A. Payne, L. M. Shewchuk, D. H. Willard, L. L. Wright, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3039–3043; c) D. G. Barrett, V. M. Boncek, J. G. Catalano, D. N. Deaton, A. M. Hassell, C. H. Jurgensen, S. T. Long, R. B. McFadyen, A. B. Miller, L. R. Miller, J. A. Payne, J. A. Ray, V. Samano, L. M. Shewchuk, F. X. Tavares, K. J. Wells-Knecht, D. H. Willard, L. L. Wright, H. Q. Zhou, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3540–3546.
- [16] Die ABPs **2** und **4** wurden durch Festphasensynthese unter Verwendung von 2-Chlortriptyl-Chlorid-Harz synthetisiert. ABP **5** wurde über eine Kombination von Festphasen- und Lösungphasenschemie hergestellt. Details sind in den Hintergrundinformationen beschrieben.
- [17] Für die Bestimmung enzymatischer Umsätze wurden die aktiven Cystein-Proteasen in AHNP-Puffer (150 mM Acetat/2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure (HEPES), 300 mM NaCl; 0.001 % Pluronic pH 6.5, 5–100 mM Cystein je nach Enzym) auf eine Endkonzentration von 10 nM verdünnt. Die in DMSO gelösten ABPs wurden in Konzentrationen von 98 μ M (**2**) und 24 μ M (**4** und **5**) zur Enzymlösung zugegeben, und die Fluoreszenzentwicklung wurde mit einem Tecan-SAFIRE-II-Spektrometer verfolgt. Die DMSO-Konzentration im Ansatz blieb unter 1 % (v/v). Stationärenzymkinetiken wurden nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate analysiert, wobei die Gleichung $v = [A]V/(K_M + (1 + ([A]/K_{si})[A]))$ verwendet wurde. Dabei ist v die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit, V die Maximalgeschwindigkeit, K_M die Michaelis-Menten-Konstante und K_{si} die Konstante der Substratinhibition.
- [18] G. Schwarz, W. H. Boehncke, M. Braun, C. J. Schröter, T. Bürster, T. Flad, D. Dressel, E. Weber, H. Schmid, H. Kalbacher, *J. Invest. Dermatol.* **2002**, *119*, 44–49.
- [19] Inhibitionssdaten (IC_{50} -Werte in μ M) für den verwendeten Cathepsin-S/L-Inhibitor: Cath S: 5.3, Cath L: 55, Cath K: 1030, Cath B: 19000 (J. P. Falgueyret, S. Desmarais, R. Oballa, C. Black, W. Cromlish, K. Khougaz, S. Lamontagne, F. Masse, D. Riendeau, S. Toulmond, M. D. Percival, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7535–7543).