

# Sensibilisierte Detektion inhibitorischer Fragmente und iterative Entwicklung nicht-peptidischer Proteaseinhibitoren durch dynamisches Ligationsscreening\*\*

Marco Florian Schmidt, Albert Isidro-Llobet, Michael Lisurek, Adeeb El-Dahshan, Jinzhi Tan, Rolf Hilgenfeld und Jörg Rademann\*

Professor Günther Jung zum 70. Geburtstag gewidmet

Gewöhnlich werden biologisch aktive, Wirkstoff-ähnliche kleine Moleküle durch Hochdurchsatzscreening chemischer Bibliotheken identifiziert. Zusammenstellung und Durchmusterung großer chemischer Bibliotheken sind jedoch zeitaufwändig und kostspielig. Der Erfolg dieses Ansatzes hängt stark von der Qualität der verfügbaren Bibliotheken ab, und selbst die größte Bibliothek kann immer nur einen winzigen Ausschnitt des virtuellen chemischen Raumes abdecken. Aus diesen Gründen wurde im Verlauf der letzten zehn Jahre eine Reihe von Strategien vorgeschlagen, die allesamt das Ziel verfolgen, den Entwicklungsprozess zu erleichtern, indem das Zielprotein als eine Schablone für den Aufbau von Liganden verwendet wird.<sup>[1–3]</sup> Die Bindung niedermolekularer Fragmente kann durch die NMR-Spektroskopie<sup>[2a–b]</sup> oder Rönt-

genkristallographie<sup>[2c–d]</sup> direkt detektiert werden. Diese biophysikalischen Methoden lieferten in einigen Fällen Liganden niedriger Affinität, die als rationale Startpunkte für die schrittweise Entwicklung potenter Protein bindender Moleküle fungierten. Alternativ dazu wurden Proteinliganden aus Gemischen von Molekülen identifiziert, die sich in einem dynamischen Gleichgewicht befanden. In Gegenwart des Proteins wurde das Gleichgewicht verschoben, die am besten bindenden Produkte wurden in dem Gemisch angereichert und konnten durch Chromatographie, Massenspektrometrie oder NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden.<sup>[3a,b]</sup> Alle bisherigen Fragment-basierten Methoden haben gemeinsam, dass sie lediglich die Bindung, nicht die biologische Aktivität von Molekülen detektieren. Darüber hinaus erfordern alle diese Methoden große Proteinmengen und haben den Nachteil einer schwierigen, zeitaufwändigen und teuren Detektion der aktiven Verbindungen.

Wir hatten die Idee, dass eine erheblich empfindlichere Detektion der bioaktiven Liganden realisierbar sein sollte, wenn reversibel gebildete Ligationsprodukte im dynamischen Gleichgewicht mit einem fluorogenen Reportersubstrat um ein Enzym konkurrieren (Abbildung 1). Dieser Ansatz würde die dynamische, Protein-unterstützte Bildung der inhibitorischen Molekülspezies und die Detektion durch Fluoreszenzscreening-Techniken kombinieren – deshalb benannten wir ihn „dynamisches Ligationsscreening“ (DLS). Im DLS-Verfahren sollten chemisch reaktive Inhibitoren als dirigierende Sonden verwendet werden können und eine Testung von inhibitorischen Fragmenten für einen definierten Bindungsort auf der Proteinoberfläche ermöglichen. Eine enzymatische Reaktion könnte die Signale zur Detektion bindender Fragmente verstärken und dadurch die erforderliche Proteinmenge drastisch reduzieren. Schließlich sollte die enzymatische Detektion durch fluoreszierende Reportermoleküle das Hochdurchsatzscreening (HTS) in Mikrotiterplatten (MTPs) ermöglichen, sodass erstmals konventionelle HTS-Techniken in der Fragment-basierten Ligandenentwicklung eingesetzt werden könnten.

Wir haben die SARS-Coronavirus-Hauptprotease (SARS-CoV M<sup>pro</sup>; SARS = schweres Atemwegssyndrom, severe acute respiratory syndrome) als Zielprotein ausgewählt, um die Anwendung der DLS-Methode zu demonstrieren. SARS-CoV M<sup>pro</sup> ist eine Cysteinprotease, die für die Replikation des Virus innerhalb der infizierten Wirtszellen essenziell ist. Daher wurde sie als ein Wirkstoffziel zur Be-

[\*] M. F. Schmidt, A. Isidro-Llobet, Dr. M. Lisurek, A. El-Dahshan, Prof. Dr. J. Rademann

Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP)

Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)

Fax: (+ 49) 309-406-2981

E-Mail: rademann@fmp-berlin.de

Homepage: <http://www.fmp-berlin.de/rademmann.html>

M. F. Schmidt, Prof. Dr. J. Rademann

Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin

Takustraße 3, 14195 Berlin (Deutschland)

A. Isidro-Llobet

Institut für Biomedizinische Forschung

Science Park, Universität Barcelona

Josep Samitier 1–5, 08028 Barcelona (Spanien)

Dr. J. Tan, Prof. Dr. R. Hilgenfeld

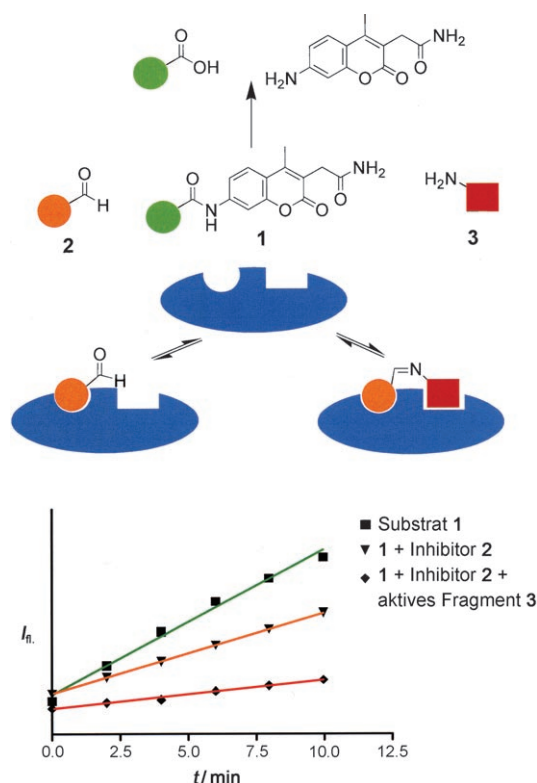
Institut für Biochemie, Zentrum für Struktur- und Zellbiologie in der

Medizin, Universität Lübeck

Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck (Deutschland)

[\*\*] Wir danken Samuel Beligny, Angelika Ehrlich, Franziska Hinterleitner, Dagmar Krause, Jörn Saupe, Bernhard Schmikale und Walter Verheyen für technische Unterstützung sowie Jeroen R. Mesters und Koen H. Verschueren für Diskussionen. Die Arbeit am FMP wurde durch die DFG (Ra 895/2-5), die Regierung von Katalonien (Stipendium an A.I.L.) und durch Boehringer Ingelheim Pharma unterstützt. Die Arbeit an der Universität Lübeck wurde durch die DFG (Hi 611/4-1), den Innovationsfond Schleswig-Holstein, das Deutsch-Chinesische Zentrum für Forschungsförderung Beijing (GZ 233-202/6) und die Europäische Kommission durch das SEPSDA Projekt (SP22-CT-2004-003831) gefördert. J.R. und R.H. danken dem FCI für Unterstützung.

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



**Abbildung 1.** Das Konzept des dynamischen Ligationsscreenings (DLS). Substrat **1** konkurriert mit dem Peptidaldehydinhibitor **2** um die SARS-CoV-Hauptprotease (blau). Das aktive Fragment **3** führt zu einer verstärkten Inhibition durch die Bindung des Iminligationsproduktes an die aktive Tasche.

handlung des schweren Atemwegssyndroms vorgeschlagen; die Hemmstoffe dieses Proteins kommen wegen der hohen Homologie mit anderen coronaviralen Proteasen auch als Wirkstoffe für andere coronavirale Infektionen infrage.<sup>[5]</sup> Einige irreversible, kovalente Peptidinhibitoren von SARS-CoV wurden bereits hergestellt und mit dem Enzym cokrystallisiert, allerdings wurde bislang erst über wenige reversible<sup>[6]</sup> nichtpeptidische<sup>[7]</sup> Hemmstoffe berichtet.

Zur Einführung der DLS-Methode für die zielgerichtete Identifizierung inhibitorischer Fragmente wurde zunächst ein Fluoreszenzassay<sup>[4]</sup> für die Aktivität von SARS-CoV M<sup>pro</sup> unter Verwendung des Substrates Ac-TSAVLQ-AMCA (**1**) entwickelt. Enzymatische Spaltung von **1** setzte 2-(7-Amino-4-methyl-3-cumarinyl)acetamid frei, dessen Fluoreszenz nach Anregung bei 380 nm bei einer Wellenlänge von 460 nm detektiert wird. Des Weiteren wurde der Peptidaldehydinhibitor **2** ausgewählt und auf dem geschützten Oxazolidinharz synthetisiert.<sup>[6]</sup> Dieser Peptidaldehyd enthält einen C-terminalen Glutaminrest und liegt deshalb in wässriger Lösung im Gleichgewicht mit seinem cyclischen Kondensationsprodukt vor.<sup>[6]</sup> Von Arylaldehyden ist bekannt, dass sie – anders als aliphatische Aldehyde wie **2** – mit einem Überschuss primärer Amine in wässriger Lösung Imine als Hauptprodukte bilden.<sup>[8]</sup> Daher blieb zu untersuchen, ob die hypothetischen Ligationsprodukte von Peptidaldehyd **2** und Nucleophilen auf einer Proteinoberfläche ausreichend stabilisiert werden,

sodass sie in der Folge durch Konkurrenzexperimente mit Substraten detektiert werden können.

Um diese Frage zu untersuchen, wurde eine Bibliothek von 234 Nucleophilen zusammengestellt, die aromatische und aliphatische Amine, Thiole sowie Hydrazine enthält. Der Aldehyd **2** als dirigierende Sonde wurde sodann mit dem achtfachen Überschuss je eines nucleophilen Fragments pro Vertiefung in Gegenwart des Enzyms auf einer 384er Mikrotiterplatte inkubiert. Nach Zugabe des Reportersubstrates **1** wurden Geschwindigkeitsunterschiede bei der Umsetzung des Substrates quantifiziert, um aktive inhibitorische Fragmente auszumachen (Abbildung 1, Tabelle 1). Keines der ausgewählten Fragmente zeigte im Kontrollexperiment bei einer Konzentration von 400  $\mu\text{M}$  Aktivität als SARS-CoV M<sup>pro</sup>-Inhibitor. Daraus kann geschlossen werden, dass die Affinität aller Fragmente alleine im millimolaren Bereich oder noch niedriger liegt. Bei sieben Nucleophilen wurde eine deutlich stärkere Inhibition als mit dem Hemmstoff **2** alleine beobachtet (Tabelle 1).

Im nächsten Schritt wurde die spezifische Bindung der Trefferverbindungen an die aktive Enzymtasche der SARS-CoV Hauptprotease überprüft, um so beispielsweise eine allosterische Bindung auszuschließen. 3-Amino-*N*-(3-amino-phenyl)benzamid (**3**) war die aktivste Verbindung und wurde

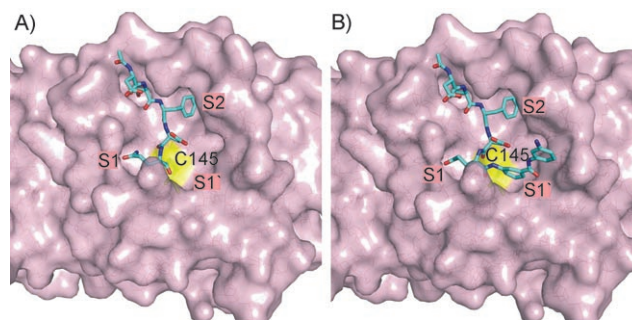
**Tabelle 1:** Anfangsgeschwindigkeiten  $v_0$  der Substratumsetzung in Gegenwart der SARS-Hauptprotease, Substrate, Peptidaldehyd **2** und aktiver nucleophiler Fragmente.<sup>[a][9]</sup>

Elektrophil	Nucleophil	$v_0$ [ $\mu\text{M min}^{-1}$ ]
–	–	$5.5 \pm 0.2$
<b>2</b>	–	$2.8 \pm 0.1$
<b>2</b>		$1.0 \pm 0.1$
<b>2</b>		$1.0 \pm 0.1$
<b>2</b>		$1.6 \pm 0.1$
<b>2</b>		$1.9 \pm 0.1$
<b>2</b>		$2.1 \pm 0.1$
<b>2</b>		$2.2 \pm 0.1$
<b>2</b>		$2.2 \pm 0.1$

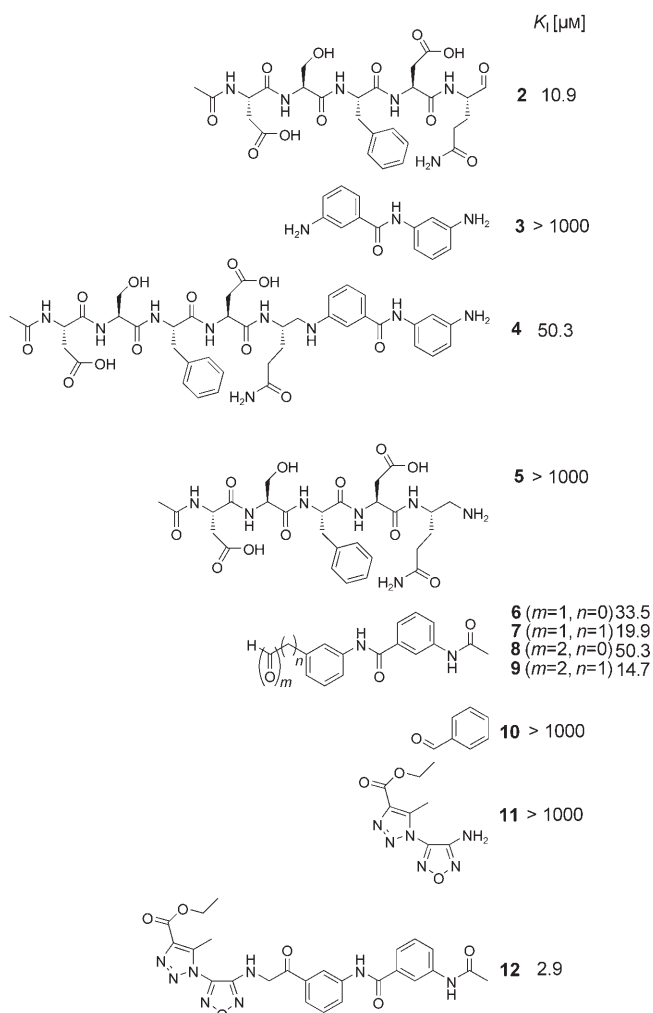
[a] Reaktionsbedingungen siehe Experimentelles.

für die exemplarische Bestätigung des Bindungsortes durch chemische Synthese und Modeling ausgewählt. Das aus **2** und **3** gebildete Imin wurde als die aktive Spezies angenommen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde zunächst das Produkt der reduzierenden Aminierung (**4**, Schema 1) synthetisiert. Die Untersuchung von **4** im HPLC-Assay von Tan et al.<sup>[11]</sup> ergab einen  $K_I$ -Wert von 50.3  $\mu\text{M}$ . Der Vergleich der inhibitorischen Aktivität von **4** mit der des reduzierten Amides **5** und derjenigen der Peptide Ac-DSFDQ-OH, DSFDQ-OH und Ac-DSFDQ-NH<sub>2</sub>, die alle bei 500  $\mu\text{M}$  vollständig inaktiv sind, spricht ebenfalls für den dirigierenden Effekt des Peptidaldehyds **2** und die Bindung des Fragmentes **3** in der S1'-Tasche. Die geringere Inhibition von **4** im Vergleich zu Peptidaldehyd **2** kann durch das Fehlen der elektrophilen Carbonylgruppe erklärt werden, die mit dem Cysteinrest der aktiven Tasche von SARS-CoV M<sup>pro</sup> wechselwirkt. Ergänzend wurde die Wechselwirkung von **2** und dem mit **3** gebildeten Imin mit der SARS-CoV-Hauptprotease

modelliert, woraus ein möglicher Bindungsmodus von Fragment **3** abgeleitet wurde (Abbildung 2).



**Abbildung 2.** Modell der Bindung des Aldehyds Ac-DSFDQ-H (Reste P5–P1) (A) und des Ligationprodukts von Ac-DSFDQ-H mit **3** in der Substratbindungsspalte der SARS-CoV M<sup>pro</sup> (cyan C, blau N, rot O). Das aktive Cys145 ist als gelbe Oberfläche markiert.<sup>[10]</sup>

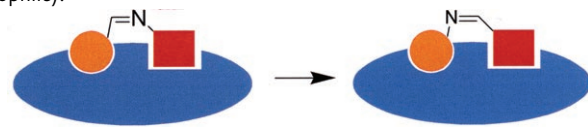


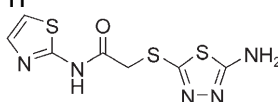
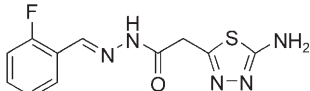
**Schema 1.** Entwicklung eines nicht-peptidischen SARS-CoV-M<sup>pro</sup>-Inhibitors durch DLS. Das aktive Fragment **3**, das in der S1'-Tasche des Proteins bindet, wurde in die elektrophilen Derivate **6–9** überführt. Diese wurden iterativ in einer „umgekehrten“ DLS eingesetzt und lieferten den nicht-peptidischen Inhibitor **12**.

Zusätzliche Belege für die Bindung von Fragment **3** in der S1'-Tasche wurden durch die Synthese und Testung der Aldehyde und 2-Ketoaldehyde **6–9** erbracht. Diese Verbindungen sind Derivate von **3**, die elektrophile reaktive Gruppen enthalten, über die sie mit dem enzymatisch aktiven Cysteinrest der Protease wechselwirken können (Schema 1). **6** und **7** wurden durch Oxidation der abgeleiteten Alkohole hergestellt, und die 2-Ketoaldehyde **8** und **9** wurden durch Polymer-unterstützte C-Acylierung, Decarboxylierung und oxidative Abspaltung von einem Phosphonharz erhalten.<sup>[12]</sup> In der Tat waren alle entworfenen Mono- und Biselektrophile aktive Inhibitoren von SARS-CoV M<sup>pro</sup> (Schema 1). **7** und **9**, die das aktive Fragment an der gleichen Stelle relativ zum Cysteinrest im aktiven Zentrum positionieren sollten wie das anfänglich postulierte Ligationprodukt, waren stärkere Inhibitoren als **6** und **8**. Das zur Kontrolle verwendete Benzaldehyd (**10**) war völlig inaktiv und lieferte damit einen weiteren Hinweis, dass die durch DLS detektierten Fragmente in der Tat spezifisch in der S1'-Tasche von SARS-CoV M<sup>pro</sup> binden.

Um einen vollständig nicht-peptidischen Inhibitor der SARS-CoV M<sup>pro</sup> zu erhalten, der die S1'- und S1-Tasche abdecken kann, wurde das dynamische Ligationsscreening iterativ im „umgekehrten“ Modus durchgeführt (Tabelle 2). Anstelle des Peptidaldehyds **2**, der auf der S-Seite der Substratbindungstasche bindet, wurde nun der 2-Ketoaldehyd **9**, der vermutlich in der S1'-Tasche bindet, als dirigierende Sonde verwendet. Für dieses Experiment wurden 110 Amine aufgrund ihrer Diversität ausgewählt und durchmustert. **9** wurde mit einem Amin pro MTP-Vertiefung, der Protease und dem fluorogenen Substrat Ac-TSAVLQ-AMCA (**1**) inkubiert. In diesem zweiten Experiment wurden drei Fragmente identifiziert, die in Gegenwart der dirigierenden Sonde **9** aktiv waren (Tabelle 2). Am aktivsten war **11**, das für eine Verifizierung der Inhibitorbindung durch chemische Synthese ausgewählt wurde. Die Verwendung der 2-Ketoaldehyde **8** und **9** schien für eine kovalente Verknüpfung vorteilhaft zu

**Tabelle 2:** Ausgehend von **3** wurde der elektrophile 2-Ketoaldehydinhibitor **9** entworfen und im „umgekehrten“ DLS verwendet (Anfangsgeschwindigkeiten der Substratumsatzung ( $\nu_0$ ) in Gegenwart aktiver Nucleophile).<sup>[a]</sup>



Nucleophil	Elektrophil	$\nu_0$ [ $\mu\text{M min}^{-1}$ ]
–	<b>9</b>	$4.3 \pm 0.1$
<b>11</b>	<b>9</b>	$2.0 \pm 0.05$
	<b>9</b>	$2.5 \pm 0.05$
	<b>9</b>	$3.7 \pm 0.1$

[a] Reaktionsbedingungen siehe Experimentelles.

sein, da in diesen Verbindungen die Aldehydfunktion für eine reduktive Aminierung zur Verfügung steht, während die 2-Ketogruppe für eine Wechselwirkung mit dem Cystein 145 intakt bleibt. Das Amin **11** wurde hergestellt, wie zuvor berichtet,<sup>[13]</sup> und für eine reduktive Aminierung von 2-Ketoaldehyd **9** mit Trichlorsilan als Reduktionsmittel verwendet;<sup>[14]</sup> so wurde das 2-Aminoketon **12** als kovalentes Ligationsprodukt erhalten. **12** inhibiert SARS-CoV M<sup>pro</sup> im HPLC-Assay<sup>[11]</sup> mit einem  $K_i$ -Wert von 2.9  $\mu\text{M}$ .

Damit haben wir gezeigt, dass das dynamische Ligationscreening (DLS) die empfindliche und orts aufgelöste Detektion von Fragmenten niedriger Affinität mit Inhibitions-konstanten im millimolaren Konzentrationsbereich ermöglicht. Mit den bisherigen dynamischen Techniken und konventionellen Fragment-basierten Methoden sind derart niederaffine Fragmente nur schwierig oder überhaupt nicht zu detektieren. Die Methode wurde im Hochdurchsatzformat durchgeführt, und nur sehr geringe Proteinmengen wurden benötigt, da der Verstärkungseffekt durch die enzymkatalysierte Detektion genutzt wurde. Eine spezielle apparative Ausstattung war nicht erforderlich, lediglich ein standardmäßiges Mikrotiterplatten-Lesegerät. Am wichtigsten ist jedoch, dass das DLS-Verfahren iterativ in einem evolutionären Prozess durchgeführt werden konnte und die Transformation eines mäßig aktiven Peptidinhibitors in einen komplett nicht-peptischen Inhibitor mit einer Inhibitions-konstante im niedrigen mikromolaren Bereich ermöglichte. Wir haben hier das dynamische Ligationscreening für die Entwicklung eines SARS-CoV-Proteaseinhibitors vorgestellt; gegenwärtig wird die Anwendung auf weitere Proteasen, andere Enzymklassen und auf Protein-Protein-Wechselwirkungen erweitert.

## Experimentelles

Die Aktivität von SARS-CoV M<sup>pro</sup> wurde durch die Spaltung des fluorogenen Substrates Ac-TSAVLQ-AMCA (**1**) und die Messung von freigesetztem AMCA bestimmt. Der Fluorophor wurde bei

380 nm angeregt, und die Emission wurde bei 460 nm aufgenommen. Relative Fluoreszenzeinheiten (RFU;  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ ) wurden als 63.9 RFU  $\mu\text{M}(\text{AMCA})^{-1}$  bestimmt. Reaktionsmischungen mit 1  $\mu\text{M}$  SARS-CoV M<sup>pro</sup> in 100 mM  $\beta$ -Morpholinoethansulfonsäure(MES)-Puffer (pH 7.0) wurden bei 298 K mit verschiedenen Konzentrationen des fluorogenen Substrates (0.25–2.5 mM) in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{L}$  inkubiert. Alle Messungen wurden auf einem TECAN-SAFIRE-Fluoreszenzplatten-Lesegerät (Grailsheim) durchgeführt.

Eine Bibliothek von 234 nucleophilen Fragmenten wurde im dynamischen Ligationscreening für die S1'-Tasche eingesetzt. Dazu wurde eine Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  SARS-CoV M<sup>pro</sup>, 200  $\mu\text{M}$  **1** und 400  $\mu\text{M}$  je eines nucleophilen Fragmentes pro Vertiefung und 50  $\mu\text{M}$  des Peptidaldehydinhibitors Ac-DSFDQ-H (**2**) auf einer 384er Mikrotiterplatte verwendet. Die Anfangsgeschwindigkeiten wurden beobachtet und mit jenen ohne nucleophiles Fragment verglichen. Dynamisches Ligationscreening für die S1-Tasche wurde mit einer Bibliothek von 110 nucleophilen Fragmenten durchgeführt. Dabei wurden 1  $\mu\text{M}$  SARS-CoV M<sup>pro</sup>, 200  $\mu\text{M}$  **1**, 200  $\mu\text{M}$  eines nucleophilen Fragmentes und 20  $\mu\text{M}$  des nicht-peptischen Inhibitors **9** in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{L}$  MES-Puffer (100 mM, pH 7.0) auf einer 384er Mikrotiterplatte verwendet. Die Anfangsgeschwindigkeit der Produktbildung wurde gemessen und mit denen der Kontrollexperimente verglichen.

Eingegangen am 4. Oktober 2007

Online veröffentlicht am 17. März 2008

**Stichwörter:** Dynamische Chemie · Enzymkatalyse · Hochdurchsatzscreening · Kombinatorische Chemie · Medizinische Chemie

- [1] Übersichtsartikel: a) P. J. Hajduk, J. Greer, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, 6, 211–219; b) J. Rademann, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 4654–4656; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4554–4556; c) P. T. Corbett, J. Leclair, L. Vial, K. R. West, J. L. Wietor, J. K. M. Sanders, S. Otto, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3652–3711; d) D. A. Erlanson, J. A. Wells, A. C. Braisted, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2004**, 33, 199–223.
- [2] a) S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **1996**, 274, 1531–1534; b) V. L. Nienhaber, P. L. Richardson, V. J. Klinghofer, J. J. Bousha, J. Greer, *Nat. Biotechnol.* **2000**, 18, 1105–1108; c) T. L. Blundell, H. Jhoti, C. Abell, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, 1, 45–54; d) A. Sharff, H. Jhoti, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 340–345.
- [3] a) I. Huc, J. M. Lehn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 2106–2110; b) J. M. Lehn, A. Eliseev, *Science* **2001**, 291, 2331–2332; c) W. J. Sanders, V. L. Nienhaber, C. G. Lerner, J. O. McCall, S. M. Merrick, S. J. Swanson, J. E. Harlan, V. S. Stoll, G. F. Stamper, S. F. Betz, K. R. Condroski, R. P. Meadows, J. M. Severin, K. A. Walter, P. Magdalinos, C. G. Jakob, R. Wagner, B. A. Beutel, *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1709–1718; d) P. Vongvilai, M. Angelin, R. Larrson, O. Ramström, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 966–968; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 948–950.
- [4] M. Meldal, I. Svendsen, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1995**, 1591–1596.
- [5] K. Anand, J. Ziebuhr, P. Wadhwani, J. R. Mesters, R. Hilgenfeld, *Science* **2003**, 300, 1763–1767.
- [6] S. I. Al-Gharabli, S. T. Ali Shah, S. Weik, M. F. Schmidt, J. R. Mesters, D. Kuhn, G. Klebe, R. Hilgenfeld, J. Rademann, *ChemBioChem* **2006**, 7, 1048–1055.
- [7] a) H. Yang, M. Yang, Y. Ding, Y. Liu, Z. Lou, Z. Zhou, L. Sun, L. Mo, S. Ye, H. Pang, G. F. Gao, K. Anand, M. Bartlam, R. Hilgenfeld, Z. Rao, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 13190–13195; b) H. Yang, W. Xie, X. Xue, K. Yang, J. Ma, W. Liang, Q.



- Zhao, Z. Zhou, D. Pei, J. Ziebuhr, R. Hilgenfeld, K. Y. Yuen, L. Wong, G. Gao, S. Chen, Z. Chen, D. Ma, M. Bartlam, Z. Rao, *PLoS Biol.* **2005**, *3*, e324; c) I. L. Lu, N. Mahindroo, P. H. Liang, Y. H. Peng, C. J. Kuo, K. C. Tsai, H. P. Hsieh, Y. S. Chao, S. Y. Wu, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5154–5161; d) S. Yang, S. J. Chen, M. F. Hsu, J. D. Wu, C. T. Tseng, Y. F. Liu, H. C. Chen, C. W. Kuo, C. S. Wu, L. W. Chang, W. C. Chen, S. Y. Liao, H. H. Hung, H. L. Shr, C. Y. Liu, Y. A. Huang, L. Y. Chang, J. C. Hsu, C. J. Peters, A. H. Wang, M. C. Hsu, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4971–4980.
- [8] C. Godoy-Alcántar, A. K. Yatsimirsky, J.-M. Lehn, *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, *18*, 979–985.
- [9] Die Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Messungen durch die Auswertung der Anfangsgeschwindigkeiten im Programm „Prism Graph Pad“ bestimmt.
- [10] Für die Modellierung wurde die Kristallstruktur von SARS-CoV M<sup>pro</sup> mit einem kovalent gebundenen Chlormethylketon als Vorlage verwendet. (Molekül A des PDB-Koordinatensatzes 1K4; Lit. [7a]). Die S2-, S1- und S1'-Taschen sind markiert. Die Aspartat-Seitenkette in Position P2 des Inhibitors ist zum Lösungsmittel hin orientiert, während das Phenylalanin in P3 die hydrophobe S2-Tasche des Enzyms besetzt. Ein ähnlicher Bindungsmodus wurde in der 1K4-Struktur durch Röntgenkristallographie gefunden (Lit. [7a]). Die Modelle wurden mit dem Programm Sybyl energieminiert. Die Abbildung wurde mit Pymol (DeLano Scientific LLC, San Carlos) generiert.
- [11] J. Tan, K. H. Verschueren, K. Anand, J. Shen, M. Yang, Y. Xu, Z. Rao, J. Bigalke, B. Heisen, J. R. Mesters, K. Chen, X. Shen, H. Jiang, R. Hilgenfeld, *J. Mol. Biol.* **2005**, *354*, 25–40.
- [12] a) A. El-Dahshan, S. Weik, J. Rademann, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 949–952; b) S. Weik, T. Luksch, A. Evers, J. Böttcher, A. Hasilik, H.-G. Löffler, G. Klebe, J. Rademann, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 445–457; c) S. Weik, J. Rademann, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2595–2598; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2491–2494.
- [13] a) V. Tselinski, S. F. Mel'nikova, S. N. Vergizov, *Transl. Org. Khim.* **1981**, *17*, 1123–1124; b) L. V. Batog, V. Y. Rozhkov, M. I. Struchkova, *Mendeleev Commun.* **2002**, *12*, 159–162.
- [14] M. Groarke, B. Hartzoulakis, M. A. McKervy, B. Walker, C. H. Williams, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 153–155.