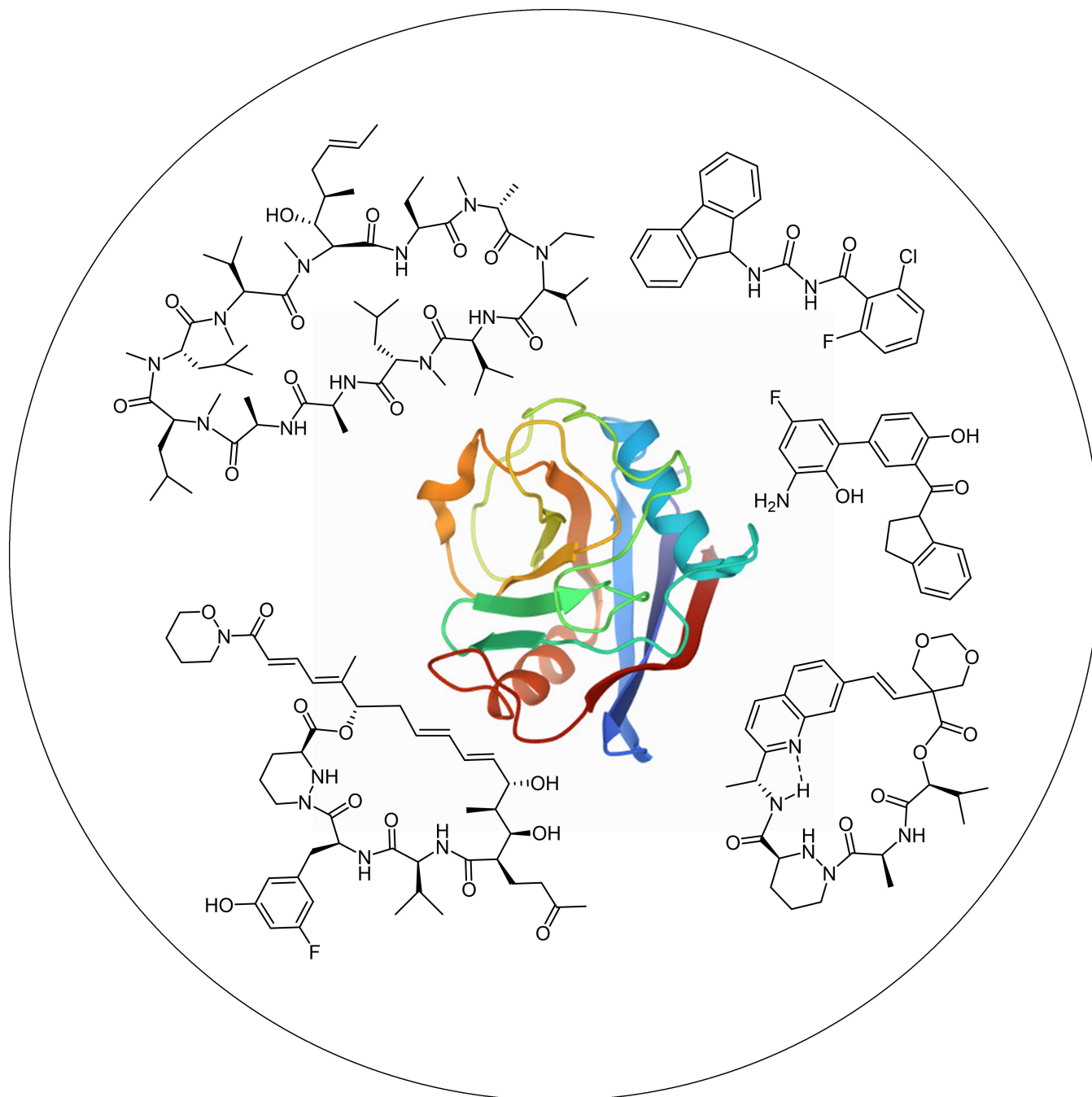


Nicht-immunsuppressive Cyclophilin-Inhibitoren

Cordelia Schiene-Fischer,* Gunter Fischer,* und Manfred Braun*



Abstract: Cyclophiline, Enzyme mit einer Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Aktivität, sind für eine Vielzahl biologischer Prozesse von Bedeutung. Das am häufigsten vorkommende Mitglied dieser Enzymfamilie, Cyclophilin A, ist der zelluläre Rezeptor des Immunsuppressivums Cyclosporin A (CsA). Aufgrund der pathophysiologischen Rolle der Cyclophiline, insbesondere bei Virusinfektionen, besteht ein breites Interesse an der Inhibierung von Cyclophilinen ohne immunsuppressive Wirkung. In diesem Überblick wird zunächst eine Einführung in die physiologische und pathophysiologische Rolle der Cyclophiline gegeben. Die Präsentation der nicht-immunsuppressiven Cyclophilin-Inhibitoren beginnt mit Wirkstoffen, die auf chemischen Modifikationen von CsA basieren. Die makrocyclischen, natürlich vorkommenden Sanglifehrine wurden zu einer weiteren Leitstruktur für Cyclophilin-inhibierende Wirkstoffe. Schließlich werden de novo entwickelte Verbindungen vorgestellt, deren Strukturen nicht von Naturstoffen abgeleitet oder durch sie inspiriert sind. Es werden relevante synthetische Konzepte erörtert, jedoch liegt auch ein Schwerpunkt auf biochemischen Untersuchungen, Struktur-Wirkungs-Beziehungen und klinischen Studien.

1. Einleitung

Die Cyclophiline gehören zur Familie der Faltungshelfer, denen eine Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase (PPIase)-Aktivität gemeinsam ist.^[1] PPIasen sind Enzyme, die die Umwandlung der Isomere *cis*-**1** und *trans*-**1** (Schema 1) durch Rotation um die imidische Peptidbindung vor Prolin, die Prolylbindung, katalytisch beschleunigen. Zu den PPIasen gehören neben den Cyclophilinen auch die FK506-bindenden Proteine und die Parvuline.^[2]

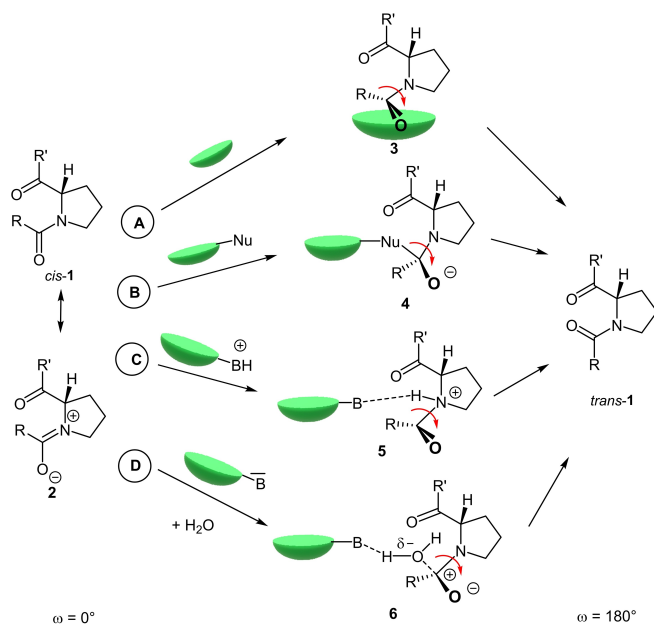
Die unkatalysierte Rotation um Prolylbindungen ist durch eine Aktivierungsbarriere von 75 bis 100 kJ mol⁻¹ gekennzeichnet, die von der Amidresonanz herrührt, die, ausgedrückt durch die mesomere Formel **2**, eine Erklärung für den partiellen Doppelbindungscharakter der Amidbindung liefert. Im Verlauf dieses Prozesses ändert sich der Torsionswinkel ω von 0 auf 180°. In Peptiden und ungefalteten Proteinen überwiegt das Isomer *trans*-**1**; allerdings enthalten native Proteine häufig eine spezifische Prolylbindung in der *cis*-Konformation. Darüber hinaus trägt die *cis/trans*-Isomerisierung spezifischer Prolylbindungen zur konformationellen Heterogenität nativer strukturierter Proteine bei.

Mehrere molekulare Mechanismen, die in Schema 1 dargestellt sind, wurden vorgeschlagen, um die Art und

Weise zu erklären, wie PPIasen die Energiebarriere der *cis/trans*-Isomerisierung katalytisch senken.^[3] Die molekulare Grundlage der Cyclophilin-Katalyse ist noch nicht vollständig verstanden. Experimentell gestützt durch Strukturdaten, zielgerichtete Mutagenese und kinetische Experimente ergaben sich verschiedene molekulare Mechanismen, darunter die Katalyse durch Verdrillung (Pfad A) sowie die Wasserstoffbrückenbildung zwischen einer Gruppe des aktiven Zentrums des Cyclophilins und dem Prolin-Stickstoff (Pfad C).

Die Bedeutung der Cyclophiline für lebende Systeme zeigt sich darin, dass sie in allen Reichen des Lebens und in allen Arten von Zellen vorkommen. In der Regel werden in ein und derselben Spezies mehrere Cyclophilin-Isoformen exprimiert.^[4]

Das prototypische Cyclophilin A (CypA) ist das am häufigsten vorkommende Mitglied der Cyclophilin-Familie



Schema 1. Mögliche katalytische Mechanismen für die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung. A) Stabilisierung des Verdrilltes-Amid-Übergangszustandes **3** durch eine hydrophobe Umgebung. B) Bildung des tetragonalen Intermediats **4** durch nukleophile Katalyse. C) Protonierung des Imid-Stickstoffs (**5**). D) Stabilisierung des Übergangszustandes **6** durch Wasser. R, R': Polypeptid-Ketten.

[*] Prof. Dr. M. Braun

Institut für Organische und Makromolekulare Chemie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
40225 Düsseldorf (Deutschland)
E-mail: braunm@hhu.de

Priv.-Doz. Dr. C. Schiene-Fischer
Institut für Biochemie und Biotechnologie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
06099 Halle (Saale) (Deutschland)

E-mail: cordelia.schiene-fischer@biochemtech.uni-halle.de

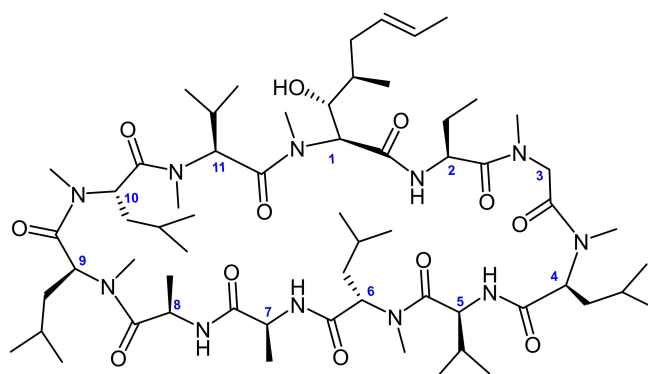
Prof. Dr. G. Fischer
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie
37077 Göttingen (Deutschland)
E-mail: gunter.fischer@mpibpc.mpg.de

© 2022 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, die eine Nutzung und Verbreitung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird und keine Änderungen und Anpassungen vorgenommen werden.

im menschlichen Gewebe und leistet einen bedeutenden Beitrag zur zellulären PPIase-Aktivität.^[5] CypA ist der zelluläre Rezeptor für das Immunsuppressivum Cyclosporin A (CsA, 7),^[6] ein cyclisches Undecapeptid (Abbildung 1, oben), das in den 1970er Jahren bei Sandoz entdeckt und entwickelt wurde und sich seitdem als unverzichtbar bei Organtransplantationen erwiesen hat.^[7] Es wird außerdem zur Behandlung von rheumatoider Arthritis, Psoriasis, des nephrotischen Syndroms und der Keratokonjunktivitis sicca eingesetzt.^[8]

CsA bindet an CypA unter Bildung eines binären Komplexes mit einer Dissoziationskonstante im unteren nanomolaren Bereich und inhibiert dadurch die PPIase-Aktivität von CypA. Die CsA-vermittelte Immunsuppression wird durch einen so genannten *gain-of-function*-Mechanismus erreicht, der durch die Bildung eines ternären Komplexes zwischen dem Wirkstoff CsA, der PPIase CypA und der Ca^{2+} -abhängigen Phosphatase Calcineurin (CN) gekennzeichnet ist, in dem die Phosphataseaktivität von CN blockiert und damit die Dephosphorylierung und der Transport des *Nuclear Factor of Activated T-Cells* (NFAT) in den Zellkern inhibiert werden.^[9] Die Strukturbestimmung des ternären Komplexes CypA-CsA-CN zeigt, dass das aktive Zentrum von CypA an die "nordwestliche" Region bindet, die die Aminosäurereste 1, 2, 9, 10 und 11 umfasst, während CN die "südöstliche" Region des cyclo-Undecapeptids CsA, die die Aminosäurereste 4 bis 7 enthält, besetzt (Abbildung 1, unten).

Aufgrund der funktionellen Bedeutung der Cyclophiline für eine Vielzahl biologischer Prozesse besteht ein großes Interesse an der Entwicklung von PPIase-Inhibitoren als



Cyclosporin A (CsA) (7)

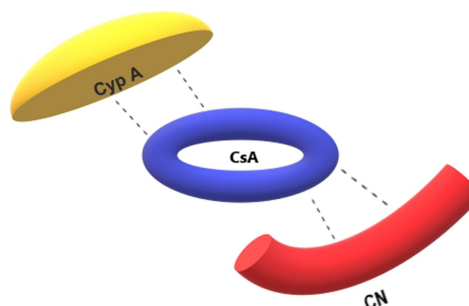
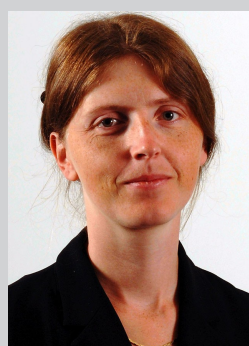


Abbildung 1. Struktur von CsA (7) (oben). Schematische Darstellung zur Veranschaulichung der Bindung im ternären CypA-CsA-CN-Komplex (unten).



Cordelia Schiene-Fischer studierte Biochemie an der Universität Halle und wurde 1999 promoviert. 2006 wurde sie unabhängige Gruppenleiterin an der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle. Seit 2012 ist sie an der Universität Halle tätig. Ihre Habilitation an der Universität Halle schloss sie im Jahr 2018 ab. Ihre Forschung beschäftigt sich mit der Enzymologie von Peptidbindungen, Peptidbindungs-cis/trans-Isomerasen und deren Inhibitoren.



Gunter Fischer studierte Chemie an der Universität Halle und promovierte 1971 bei Professor Alfred Schellenberger. Dort habilitierte er 1978. Im Jahr 1992 wurde er Gruppenleiter der Forschungsgruppe "Enzymologie der Peptidbindung" der Max-Planck-Gesellschaft in Halle. Seit 1992 ist er Professor für Molekulare Biochemie an der Universität Halle. Im Jahr 1997 wurde er Direktor der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle. Seine Forschung konzentrierte sich auf die Struktur und Aktivität von Proteinfaltungshelferenzymen und die Wirkung von Iminosäuren auf die Proteinkonformationen. Er ging 2012 in den Ruhestand.

Helferenzymen und die Wirkung von Iminosäuren auf die Proteinkonformationen. Er ging 2012 in den Ruhestand.



Manfred Braun studierte Chemie an der Universität Karlsruhe und promovierte 1975 bei Professor Dieter Seebach in Gießen. Nach einem Postdoc-Aufenthalt bei Professor George H. Büchi am Massachusetts Institute of Technology wechselte er in die Forschungsgruppe von Professor Hans Musso an der Universität Karlsruhe und habilitierte sich dort im Jahre 1981. Seit 1985 ist er Professor für Organische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die Forschungsgebiete, zu denen er beigetragen hat, sind hauptsächlich die Entwicklung

neuer Synthesemethoden (insbesondere für die asymmetrische Synthese) und die Synthese biologisch aktiver Verbindungen. Im Jahr 2014 ging er in den Ruhestand.

mechanistische Werkzeuge und potenzielle Arzneimittel für verschiedene Krankheiten.^[4c,10] Vor allem Verbindungen, die ausschließlich Cyclophiline inhibieren, ohne Nebeneffekte zu haben, sind sehr erwünscht. Da festgestellt wurde, dass Cyclophiline als Wirtspoteine fungieren, die von einer großen Anzahl verschiedener Viren zur Replikation benötigt werden, ist es eine besonders interessante Idee, Cyclophilin-Inhibitoren als antivirale Wirkstoffe zu entwickeln.^[11] Für das Ziel der Entwicklung eines antiviralen Cyclophilin-bindenden Arzneimittels ist allerdings eine immunsuppressive Wirkung höchst kontraproduktiv, da sie das Immunsystem blockieren würde. Die Entwicklung von Cyclophilin-Inhibitoren, die als antivirale Wirkstoffe fungieren könnten, erfordert daher, dass die durch die CN-Inhibierung verursachte immunsuppressive Aktivität reduziert oder aufgehoben wird, mit anderen Worten: Die Bindung eines CsA-Derivats oder eines anderen de novo entwickelten Cyclophilin-Inhibitors an CN muss verhindert werden.

2. Cyclophiline

2.1. Cyclophiline und ihre physiologischen Funktionen

Cyclophiline sind mit ihrer typischen dreidimensionalen Struktur bestehend aus einem achtsträngigen antiparallelen β -Fass, das von α -Helices verschlossen wird, über die Evolution hinweg hochkonserviert.

Unter den achtzehn verschiedenen humanen Cyclophilin-Isoenzymen gibt es acht Einzeldomänen-Cyclophiline, die nur aus der Cyclophilin-Domäne von etwa 18 kDa selbst und in einigen Fällen aus zusätzlichen Lokalisierungssignalen bestehen, und zehn Multidomänen-Proteine. Bei diesen wird die prototypische Cyclophilin-Domäne durch N- oder C-terminale Domänen oder Module mit unterschiedlichen regulatorischen oder signalgebenden Funktionen ergänzt. Das prominenteste Mitglied der Einzeldomänen-Cyclophiline, das zytoplasmatische CypA, ist die erste PPIase, die entdeckt wurde.^[1a] Es erreicht in vielen Säugetierzellen hohe Konzentrationen, zum Beispiel macht es 0,4 % der gesamten zytosolischen Proteinfraction in T-Zellen aus.^[12] Verschiedene andere Cyclophilin-Isoenzyme sind spezifisch in verschiedenen subzellulären Kompartimenten von Zellen zu finden. Humanes Cyclophilin B (CypB) unterscheidet sich von CypA hauptsächlich durch das Vorhandensein einer spaltbaren N-terminalen Signalsequenz, die das Protein zum endoplasmatischen Retikulum (ER) leitet. Humanes Cyclophilin D (CypD) ist ein Einzeldomänen-Cyclophilin, das sich in der mitochondrialen Matrix befindet, und acht Cyclophiline kommen hauptsächlich im Zellkern vor. Interessanterweise wurden mehrere der nukleären Cyclophiline in spezifischen spleißosomalen Komplexen identifiziert.^[13] Bei den größeren Cyclophilinen wird die Cyclophilin-Domäne von verschiedenen funktionellen Domänen begleitet, von denen bekannt ist, dass sie am intrazellulären Targeting, an der RNA-Erkennung und an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind.^[4b]

Zu den konservierten charakteristischen Aminosäureresten, die an der Bildung des aktiven Zentrums beteiligt und

für die PPIase-Aktivität der Cyclophiline wesentlich sind, gehören ein Phenylalaninrest und ein Argininrest, die sich in Position 60 bzw. Position 55 des prototypischen menschlichen CypA befinden (Abbildung 2). Für CypA konnte

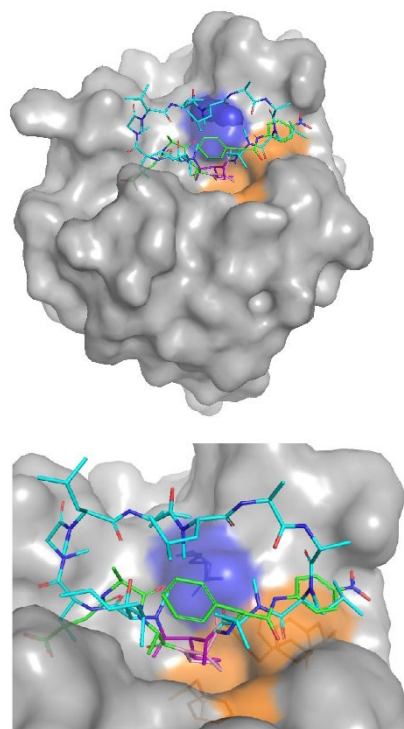


Abbildung 2. Überlagerung von CypA-Komplexen (oben) mit dem Substrat Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-Nitroanilid (grün, PDB ID: 1RMH)^[35] mit dem Pro-Rest in Rosa und CsA (cyan, PDB ID: 1CWA)^[36] mit [MeVal]¹¹ in Lila (oben). Vergrößerung des aktiven Zentrums der PPIase (unten). Hervorgehoben ist die Oberfläche von Phe60, Met61, Phe113 und Leu122 in Orange und von Arg55 in Blau.

gezeigt werden, dass die Seitenkette von Phe60 als Teil der Bindungstasche des Prolylrings die korrekte Substratpositionierung vermittelt und dass die Guanidiniumgruppe von Arg55 wahrscheinlich die Katalyse fördert, indem sie die sp^3 -Hybridisierung des Prolinstickstoffs im Übergangszustand stabilisiert (Schema 1, Pfad C).

Zur Ermittlung der PPIase-Aktivität von Cyclophilinen können Verfahren verwendet werden, bei denen die *cis/trans*-Isomerisierung einer Prolylbindung mit einem schnellen irreversiblen Prozess mit hoher Spezifität für eines der Isomere gekoppelt ist. Die Proteolyse von Modells substraten der Form Succinyl-Ala-Xaa-Pro-Yaa-*p*-Nitroanilid durch isomerenspezifische Proteasen wie Chymotrypsin oder Trypsin, die die Yaa-*p*-Nitroanilid-Bindung nur dann spalten, wenn sich die Xaa-Pro-Bindung in der *trans*-Konformation befindet, wird zweckmäßigerweise zur Beobachtung der *cis/trans*-Isomerisierung der Xaa-Pro-Bindung und ihrer Beschleunigung durch Cyclophiline oder andere PPIasen eingesetzt.^[1a] Modifikationen des Assaysystems wurden genutzt, um die Signalamplitude zu verbessern und sogar

einen proteasefreien Nachweis der PPIase-Aktivität zu ermöglichen.^[14]

Im Allgemeinen besitzen Cyclophiline eine relativ breite Spezifität für den Aminosäurerest Xaa.^[15] Mehrere der Einzeldomänen-Cyclophiline entfalten eine hohe katalytische Kraft mit katalytischen Effizienzen im diffusionskontrollierten Bereich, während Multidomänen-Cyclophiline in der Regel Spezifitätskonstanten aufweisen, die im Vergleich zu denen von CypA deutlich niedriger sind.^[3]

Cyclophiline sind an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt, zum Beispiel an der Faltung, den posttranslationalen Modifikationen und dem Transport von Proteinen, dem Aufbau wesentlicher zellulärer Proteinkomplexe und der Zellsignalgebung. Es wurde nachgewiesen, dass zahlreiche Proteine mit bestimmten Cyclophilinen interagieren und von ihnen funktionell kontrolliert werden.^[16] Drei Einzeldomänen-Cyclophilin-Isoenzyme von Säugetieren, CypA, CypB und Cyclophilin C (CypC), die nicht nur innerhalb von Zellen, sondern auch im extrazellulären Raum vorkommen, sind an der Steuerung der Zell-Zell-Kommunikation beteiligt.^[4b,17]

Cyclophiline sind Ziel von posttranslationalen Modifikationen, die sowohl die PPIase-Aktivität als auch die Anfälligkeit für eine Inhibierung dieser Enzyme beeinflussen können. CypA beispielsweise wird innerhalb von Zellen und im extrazellulären Raum acetyliert. Es wurde gezeigt, dass die Acetylierung von CypA an Lys128 die PPIase-Aktivität des Enzyms reduziert und die Bindung an CsA verringert, obwohl die Affinität von acetyliertem CypA zu CsA immer noch im nanomolaren Bereich liegt.^[18] Bisher wurden die Auswirkungen posttranslationaler Modifikationen auf die enzymatischen Eigenschaften von Cyclophilinen jedoch für die verschiedenen Cyclophilin-Isoenzyme nicht im Detail untersucht.

Für die Aufklärung der Rolle der verschiedenen Cyclophilin-Isoenzyme sowie für eine niedrig dosierte Anwendung im zellulären Kontext wäre die Verfügbarkeit spezifischer Inhibitoren für eine bestimmte Isoform des Cyclophilins von Vorteil. Andererseits bietet die Existenz von Pancyclophilin-Inhibitoren die Möglichkeit, Prozesse zu unterdrücken, bei denen eine Redundanz verschiedener Cyclophiline auftritt.

2.2. Pathophysiologische Bedeutung der Cyclophiline

Die physiologischen Funktionen verschiedener Cyclophiline sind oftmals von pathophysiologischer Bedeutung, und Cyclophiline sind an verschiedenen Erkrankungen beteiligt.^[4b,19]

2.2.1. Cyclophiline bei viralen Infektionen

CypA als Wirtszellprotein interagiert mit viralen Proteinen und kann so bei einer Vielzahl von RNA-Viren, vor allem HIV-1 und HCV, die virale Replikation und Infektion fördern oder inhibieren. Zu den CypA-abhängigen Viren gehören auch das Influenza-A-Virus, Flaviviren wie das

West-Nil-Virus, das Dengue-Virus, das Zeckenzephalitis-Virus, das Gelbfieber-Virus und das Zika-Virus sowie Nidoviren wie NL63, das MERS- und das SARS-Coronavirus.^[19f,g,20] Für einige Viren wurde eine Interaktion von viralen Proteinen mit anderen Cyclophilin-Isoformen neben CypA, hauptsächlich mit CypB, beschrieben.

In HIV-1 bindet CypA an das p24-Kapsidprotein an der Sequenz um Gly89 und Pro90 und wird in naszierende Virionen eingebaut. CypA scheint an mehreren Schritten während der HIV-1-Replikation und -Infektion beteiligt zu sein. Es wird davon ausgegangen, dass es das Uncoating des Viruspartikels, die reverse Transkription und den Kernimport fördert. Außerdem wurde gezeigt, dass CypA HIV-1 vor der Restriktion durch den Restriktionsfaktor *tripartite-containing motif* (TRIM) 5α schützt, bevor die reverse Transkription abgeschlossen ist.^[19f,21] Bei HCV wurde zunächst beobachtet, dass CypB mit der viralen RNA-Polymerase NS5B interagiert. Später wurde festgestellt, dass die direkte Interaktion von CypA mit den Domänen II und III des NS5A-Proteins für HCV-Replikation und -Zusammenbau wichtig ist. NS5A und CypA spielen eine Rolle bei der Bildung membranöser Replikationsorganellen, von denen man annimmt, dass sie virale Replikationsintermediate vor zytosolischen Mustererkennungsrezeptoren abschirmen.^[19g,22]

Die Inhibierung von CypA durch CsA und CsA-Analoga hat sich als klinisch wirksam gegen HCV und HIV-1 erwiesen.^[11a,b] Solche auf den Wirt ausgerichteten antiviralen Verbindungen gelten als vorteilhaft, da die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzbildung gering ist und eine breite Spezifität für verschiedene Subtypen eines Virus besteht.

Es wurde auch gezeigt, dass CsA die Vermehrung verschiedener Arten von Coronaviren wie HCoV-229E, HCoV-NL63, MERS- und SARS-Coronavirus (CoV) in menschlichen Zellen unterdrückt, was auf eine Beteiligung von Cyclophilinen bei den entsprechenden Prozessen hindeutet.^[23] Die Abreicherung von CypA in menschlichen Zellen unterdrückte die Replikation von HCoV-229E, HCoV-NL63 und MERS-CoV.^[20c,23b] Bei SARS-CoV bleibt die Rolle von CypA unklar, da die Abreicherung von CypA in menschlichen Zellen nicht zu einer Verringerung der SARS-CoV-Replikation führte.^[24]

Die Bewertung verschiedener Arzneimittel mit bekannter antiviraler Aktivität gegen das neue SARS-CoV2 zeigte die inhibierende Wirkung von CsA mit einem niedrigen mikromolaren IC₅₀-Wert gegen die Virusproduktion und die Interaktion zwischen CypA und dem Nukleokapsid(N)-Protein.^[25] Interessanterweise wurde festgestellt, dass die Anwendung von CsA zusätzlich zu einer Steroidbehandlung mit einem Rückgang der Sterblichkeit von COVID-19-Patienten verbunden war.^[26] Dieses Ergebnis könnte darauf zurückzuführen sein, dass die CypA/CsA-vermittelte Inhibierung von CN die Hyperinflammation bei COVID-19 reduziert; allerdings könnte auch eine direkte Inhibierung von CypA an der Wirksamkeit von CsA beteiligt sein, da CypA sowohl an der Virusreplikation als auch an entzündlichen Prozessen beteiligt ist.

2.2.2. Cyclophiline bei Entzündungen

Insbesondere Cyclophiline, die in den extrazellulären Raum sezerniert werden, spielen eine wichtige Rolle bei menschlichen Erkrankungen, die mit akuten oder chronischen Entzündungen einhergehen, wie rheumatoide Arthritis, Sepsis, Asthma und Herz-Kreislauf-Erkrankungen.^[4b, 19e, 27, 28] Hier ist CypA an der Bildung von Bauchaortenaneurysmen, Atherosklerose, Ischämie und Reperfusion des Herzmuskels, entzündlichen und hypertrophen Kardiomyopathien und Thrombose beteiligt. Es wurde festgestellt, dass prägende Ereignisse dieser Erkrankungen in CypA-Knockout-Mausmodellen oder durch die Inhibierung von CypA reduziert werden.^[18b, 28]

Extrazelluläre Cyclophiline initiieren Signalkaskaden von Entzündungsprozessen durch Bindung an das Transmembranprotein CD147.^[17c, 19e]

2.2.3. Cyclophiline in zelltodbezogenen Prozessen

Das mitochondriale Cyclophilin CypD ist als Regulator der mPTP-Öffnung, eines Charakteristikums mitochondrialer Dysfunktion, die zum Zelltod führt, an pathophysiologischen Prozessen beteiligt, die mit Nekrose und Apoptose einhergehen, wie beispielsweise Ischämie-/Reperfusionsschäden in Gehirn, Herz und Niere, neurodegenerativen Erkrankungen, Muskeldystrophien und nichtalkoholischer Steatohepatitis (NASH).^[29] Bei der Alzheimer-Krankheit ist CypD an der A β -induzierten mitochondrialen Störung und dem damit verbundenen neuronalen Zelltod beteiligt, wofür die direkte Interaktion von CypD mit dem mitochondrialen A β von Bedeutung ist.^[30]

2.2.4. Cyclophiline bei Krebs

Die Expression von Mitgliedern der Cyclophilin-Familie ist bei verschiedenen humanen Krebserkrankungen erhöht. So wird eine Überexpression von CypA mit Leberzell-, Magen-, Nasopharyngeal- und Plattenepithelkarzinomen sowie Bauchspeicheldrüsenkrebs in Verbindung gebracht.^[31] Die erhöhte CypA-Expression in Tumorzellen scheint in kausalem Zusammenhang mit der malignen Zelltransformation zu stehen: Die Reduktion der CypA-Expression durch RNAi führte zu einer Inhibierung des Tumorwachstums.^[32] Möglicherweise fördert CypA das zelluläre Überleben unter den Stressbedingungen von Krebs und ist wichtig für die Aufrechterhaltung der aktiven Konformation onkogener Proteine.

3. Nicht-immunsuppressive Cyclooligopeptide abgeleitet von Cyclosporin A

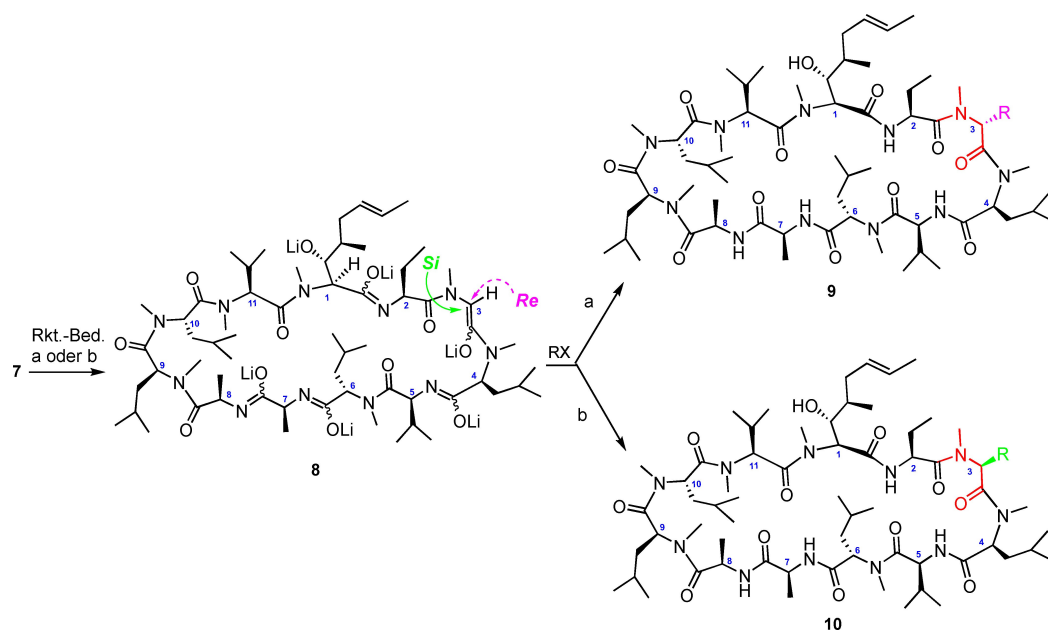
3.1. Allgemeine Aspekte der Inhibierung durch CsA und Strategien zur CypA-Modifikation

Aufgrund seiner nanomolaren Affinität zu CypA kann das aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum* isolierte cyclische Undecapeptid CsA als Goldstandard für die Inhibierung von Cyclophilinen angesehen werden. Da CsA jedoch nicht nur die PPIase-Aktivität von Cyclophilinen inhibiert, sondern im Komplex mit CypA auch die Phosphatase-Aktivität von CN und die Aktivität mehrerer zellulärer Transporter,^[33] kann als Ursache für die biologischen Folgen der Anwendung von CsA entweder i) die direkte Inhibierung der PPIase-Aktivität eines oder mehrerer Mitglieder der Cyclophilin-Familie, ii) die durch *gain-of-function* vermittelte Inhibierung der Phosphatase-Aktivität von CN oder iii) die Inhibierung eines Transporters betrachtet werden.

Um nicht-immunsuppressive CsA-Derivate zu entwickeln, wurde eine Doppelstrategie verfolgt: Aufrechterhaltung oder sogar Verstärkung der Bindung an Cyclophilin und möglichst weitgehende Verringerung der Affinität zu CN. Für eine effektive CypA-Bindung werden die Reste der "nordwestlichen" Region des CsA benötigt. Im CypA–CsA-Komplex befindet sich die zentrale [MeVal]¹¹-Einheit von CsA in der Prolin-Bindungstasche, die von den Resten Phe60, Met61, Phe113 und Leu122 in CypA gebildet wird (Abbildung 2). Im Cyclophilin-gebundenen Zustand nimmt die Amidbindung zwischen [MeLeu]⁹ und [MeLeu]¹⁰ die *trans*-Konformation ein, und die Amidbindung zwischen [MeBmt]¹ und [Abu]² ist exponiert und somit für intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zu den CypA-Resten Glu63 und Asn102 verfügbar.^[34]

Die Konformation, die CsA annimmt, wenn es an das aktive Zentrum von Cyclophilinen gebunden ist, ist derjenigen in Wasser und anderen polaren Lösungsmitteln sehr ähnlich^[37a] und unterscheidet sich von der im kristallinen Zustand mit der darin enthaltenen 9,10-*cis*-Amidbindung.^[37b] Durch Bindung an das aktive Zentrum von Cyclophilinen wirkt CsA als kompetitiver, hochaffiner Inhibitor der PPIase-Aktivität von Cyclophilinen mit einem K_i -Wert von 1.6 nM für CypA. Die hohe Affinität von CsA hängt vom Vorhandensein eines Tryptophan-Rests (Trp121 in CypA) im aktiven Zentrum des Cyclophilins ab, das in neun der humanen Cyclophiline enthalten ist.^[14a, 38]

Zur Gewinnung von nicht-immunsuppressiven CsA-Derivaten sind verschiedene Ansätze verfolgt worden: So erfolgte durch Fermentation nicht nur die industrielle Herstellung der Stammverbindung, sondern auch die Erzeugung mehrerer Derivate. Außerdem wurden Totalsynthesen durchgeführt. Sie stützen sich auf etablierte Methoden der Peptidsynthese, um das lineare Undecapeptid aufzubauen, das anschließend cyclisiert wird.^[39] Totalsynthesen wurden zur Gewinnung spezieller Derivate oder Metabolite durchgeführt, aber kaum zur Synthese von Arzneimitteln. Für letzteren Zweck ist die Partialsynthese die Methode der Wahl. Sie geht von der Stammverbindung oder einem



Schema 2. Modifikation von [Sar]³ in CsA durch Alkylierung des Enolats **8**. Bedingungen: a) 6–14 Äquiv. LDA, Elektrophil RX, ca. –78 °C, THF; b) bis zu 30 Äquiv. LiCl, 6,5 Äquiv. LDA, 6 Äquiv. BuLi, Elektrophil RX, ca. –78 °C in THF.

biotechnologisch hergestellten Derivat aus und modifiziert sie durch chemische oder enzymatische Umwandlungen.

3.2. Nicht-immunsuppressive CsA-Derivate modifiziert in den Positionen 3 und 4

3.2.1. Modifikationen von Position 3 ([Sar]³)

Interessanterweise kann eine Modifikation von Rest 3 des CsA sowohl die CN-Bindung beeinflussen als auch sich direkt oder durch Konformationsänderungen auf die Cyp-Bindung auswirken. [Sar]³ befindet sich an der Schnittstelle der beiden Proteine im Cyp-CsA-CN-Komplex. Eine bahnbrechende und phantasievolle Methode zur Derivatisierung von CsA an dieser Position wurde in den 1990er Jahren von der Seebach-Gruppe in Zusammenarbeit mit Sandoz entwickelt.^[40] Es wurde die Metallierung von CsA mit Lithiumdiisopropylamid (LDA) und/oder *n*-Butyllithium (BuLi), die beide in hohem Überschuss eingesetzt wurden, untersucht. Obwohl zahlreiche Nebenreaktionen und Zersetzungen in Betracht gezogen werden mussten, führten die Metallierungsexperimente sauber zu dem hexalithiierten Zwischenprodukt **8**, das aus einem Lithiumalkoxid, vier Lithiumazaenolaten und einer Lithiumenolateinheit, der von Sarkosin, besteht (Schema 2). Die anschließende Alkylierung ist hochselektiv und erfolgt ausschließlich am Sarkosin-Enolat in Position 3.

Darüber hinaus lässt sich die Diastereoselektivität kontrollieren: Je nach Reaktionsbedingungen (LDA versus LiCl/LDA/BuLi) wird entweder das Diastereomer **9** durch einen überwiegenden *Re*-Seiten-Angriff auf den Sarkosin-Enolat-Anteil gebildet oder die Diastereomere **10** werden selektiv durch einen *Si*-Seiten-Angriff erhalten. Obwohl die

Diastereoselektivität nicht vollständig ist, konnte das Hauptisomer in den meisten Fällen durch Säulenchromatographie leicht isoliert werden. Auf den ersten Blick ist dieses abweichende stereochemische Ergebnis überraschend, da das “gleiche” Zwischenprodukt **8** als Nukleophil dient. Allerdings muss man sich der unterschiedlichen Solvatisierung des Lithium-Enolats unter den verschiedenen Bedingungen bewusst sein.^[41]

Bemerkenswerterweise erwiesen sich zwei Sarkosin-alkylierte Produkte **9**, nämlich [D-MePhe]³- und [D-(3-Hydroxy)-MePhe]³-CsA, [**9**, R = CH₂Ph und R = CH₂(3-HO)C₆H₄], die nach diesem Protokoll hergestellt wurden, als die ersten Verbindungen, die nicht immunsuppressiv sind, während sie mit einer ähnlichen Affinität wie CsA an CypA binden.^[42] Die Metallierung von CsA und verschiedener seiner Derivate und die anschließende Behandlung des Enolats mit unterschiedlichen Kohlenstoff- und Heteroelektrophilen ermöglichte die Einführung einer großen Vielfalt von Seitenketten. Wenn diese funktionelle Gruppen enthalten, wurde die Möglichkeit einer weiteren Derivatisierung eröffnet.^[43] So wurde beispielsweise die Benzoat-Substitution im Sarkosin-Derivat [(4-Carboxy)-MePhe]³-CsA [**9/10**, R = CH₂(4-CO₂H)C₆H₄], das die PPIase-Aktivität von CypA und CypD ähnlich wie CsA selbst inhibiert, dazu verwendet, das lipophile Alkyltriphenylphosphonium-Kation zwecks Mitochondrien-Targeting über einen Spacer mit CsA anzubinden.^[44]

3.2.2. Modifikationen der Position 4 ([MeLeu]⁴)

Eine sehr effiziente Modifikation zur Aufhebung der Immunsuppression ist die Substitution des [MeLeu]⁴-Restes von CsA. Frühe Studien von CsA-Derivaten, die bei Sandoz

durchgeführt wurden, führten zu dem Schluss, dass die Seitenkette in Position 4 des CsA eine für seine Affinität besonders wichtige Interaktion mit CN eingeht.^[45] Eine Erklärung für diesen Effekt lieferte die Strukturaufklärung des CypA-CsA-CN-Komplexes, aus der hervorgeht, dass der [MeLeu]⁴-Rest in ein kompaktes "aromatisches Sandwich" mit den Trp352- und Phe356-Resten der katalytischen Untereinheit von CN als Hauptbindungskraft zu diesem Protein eingebunden ist (Abbildung 3).

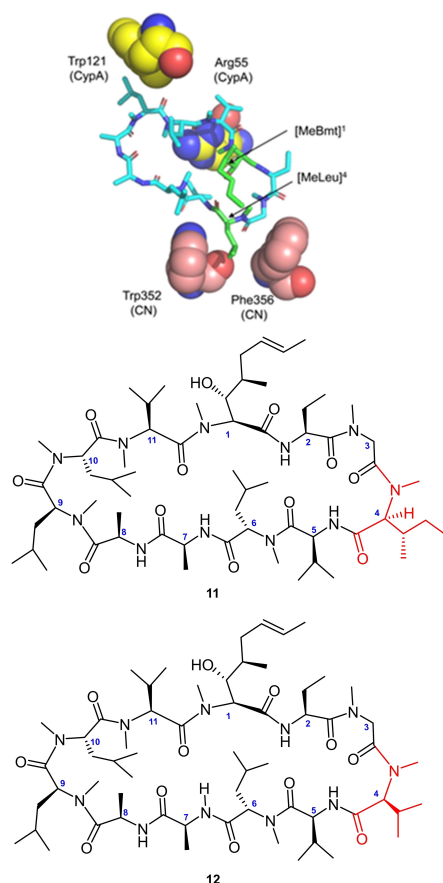


Abbildung 3. Lage der Aminosäurereste von CypA und CN, die für die CsA-Bindung oder Katalyse relevant sind, relativ zu CsA im CypA-CsA-CN-Komplex (PDB ID: 1M63)^[9b] (oben); Strukturen der nicht-immunsuppressiven CsA-Derivate [MeIle]⁴-CsA (NIM-811) (**11**) und [MeVal]⁴-CsA (**12**) (unten).

Dies steht im Einklang mit der früheren Beobachtung, dass eine scheinbar kleine Veränderung, nämlich der Ersatz von *N*-Methylleucin durch *N*-Methylisoleucin, zu dem nicht-immunsuppressiven Derivat [MeIle]⁴-CsA führt, das als NIM-811 (**11**) bekannt wurde. Diese Verbindung wurde mittels Fermentation eines Stammes von *Tolypocladium inflatum* (syn. *T. niveum*) in Gegenwart von D-Threonin im Kulturmedium hergestellt und durch wiederholte Chromatographie aus einer komplexen Mischung von Cyclosporinen mit CsA als Hauptbestandteil isoliert.^[46] Eine weitere frühe Beobachtung, die darauf hindeutet, dass die Methylengruppe des MeLeu-Restes von CsA für die Wechselwirkung mit

CN entscheidend ist und dass α -verzweigte Reste in Position 4 von CsA zur Verringerung der immunsuppressiven Eigenschaften der Verbindung beitragen, wurde durch das Derivat [MeVal]⁴-CsA (**12**) geliefert: Es bindet mit einer ähnlichen Affinität an CypA wie CsA, weist aber einen 2500-fachen Verlust an immunsuppressiver Aktivität auf.^[47] Eine ähnliche Abnahme der immunsuppressiven Aktivität wurde für die entsprechenden *N*-Ethyl-Derivate [EtIle]⁴-CsA und [EtVal]⁴-CsA beobachtet.^[48] Auch ein hydroxylierter [MeLeu]⁴-Rest in [4'HO-MeLeu]⁴-CsA führt zur Verringerung der immunsuppressiven Eigenschaften der Verbindung.^[49] Mehrere weitere relativ kleine Modifikationen in Position 4 führen nur zu geringfügigen Veränderungen des immunsuppressiven Potenzials der Verbindung im Vergleich zu CsA.^[45]

NIM-811 (**11**) besitzt eine stark reduzierte immunsuppressive Aktivität, die 1700-mal geringer ist als die von CsA, behält aber mit einem K_i -Wert von 2.1 nM die volle Fähigkeit, die PPIase-Aktivität von CypA zu inhibieren.^[50] Das CsA-Derivat weist eine starke antivirale Aktivität gegen HIV-1 und HCV auf.^[46,51] Die Anwendung von NIM-811 (**11**) führt auch zu entzündungshemmenden Wirkungen. Es reduziert die Leukozytenzahl im Lungengewebe und in den Atemwegen von allergischen Mäusen und inhibiert die Thrombozytenaktivierung während der Thrombozyten-abhängigen Thrombusbildung.^[52]

Wie CsA ist NIM-811 (**11**) in der Lage, das mitochondriale Cyclophilin CypD zu inhibieren, das die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätsübergangspore kontrolliert.^[53] Diese Inhibierung führt zu einer Unterdrückung des mitochondrialen Permeabilitätsübergangs, eines Schlüsselereignisses des Zelltodes. Man geht davon aus, dass diese Inhibierung die Grundlage für die schützende Wirkung von NIM-811 (**11**) gegen Ischämie-/Reperfusionsschäden in Herz, Leber und Skelettmuskel bildet. Darüber hinaus ist NIM-811 (**11**) im Gegensatz zu CsA selbst in der Lage, die intakte Blut-Hirn-Schranke zu durchdringen, was es ermöglicht, den mitochondrialen Permeabilitätsübergang zu verhindern und somit vor zerebralen Ischämie-/Reperfusionsschäden zu schützen.^[54] Darüber hinaus hat NIM-811 (**11**) eine positive Wirkung in Modellen der angeborenen Kollagen-VI-Muskeldystrophie, bei der die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätsübergangspore ein entscheidender Faktor der Pathogenese ist.^[55]

Die Modifizierung der Position 4 scheint die Inhibierung der PPIase-Aktivität von CypD nicht zu beeinflussen; [MeVal]⁴-CsA (**12**) zeigt im Vergleich zu CsA nur eine leicht verringerte Inhibierung der PPIase-Aktivität von CypD, inhibiert aber immer noch effizient die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätsübergangspore.^[56] Die antiangiogenetische Wirkung von [MeVal]⁴-CsA (**12**) erbrachte den Nachweis eines CN-unabhängigen Mechanismus der CsA-vermittelten Inhibierung der Angiogenese.^[57]

3.2.3. Modifikationen der Positionen 3 und 4: Alisporivir (13), SCY-635 (14), STG-175 (15) und NIM-258 (16)

Auf der Grundlage dieser vorteilhaften Wirkungen, die die strukturellen Variationen der Aminosäuren 3 oder 4 aufweisen, wurden weitere nicht-immunsuppressive Derivate durch Kombination von Modifikationen an den Positionen 3 und 4 in CsA entwickelt. Dieses Konzept erwies sich als fruchtbar und führte zu den Wirkstoffen Alisporivir (Debio025) (13) als dem am weitesten fortgeschrittenen Arzneimittel in dieser Reihe und SCY-635 (14) (Abbildung 4). Neben dem

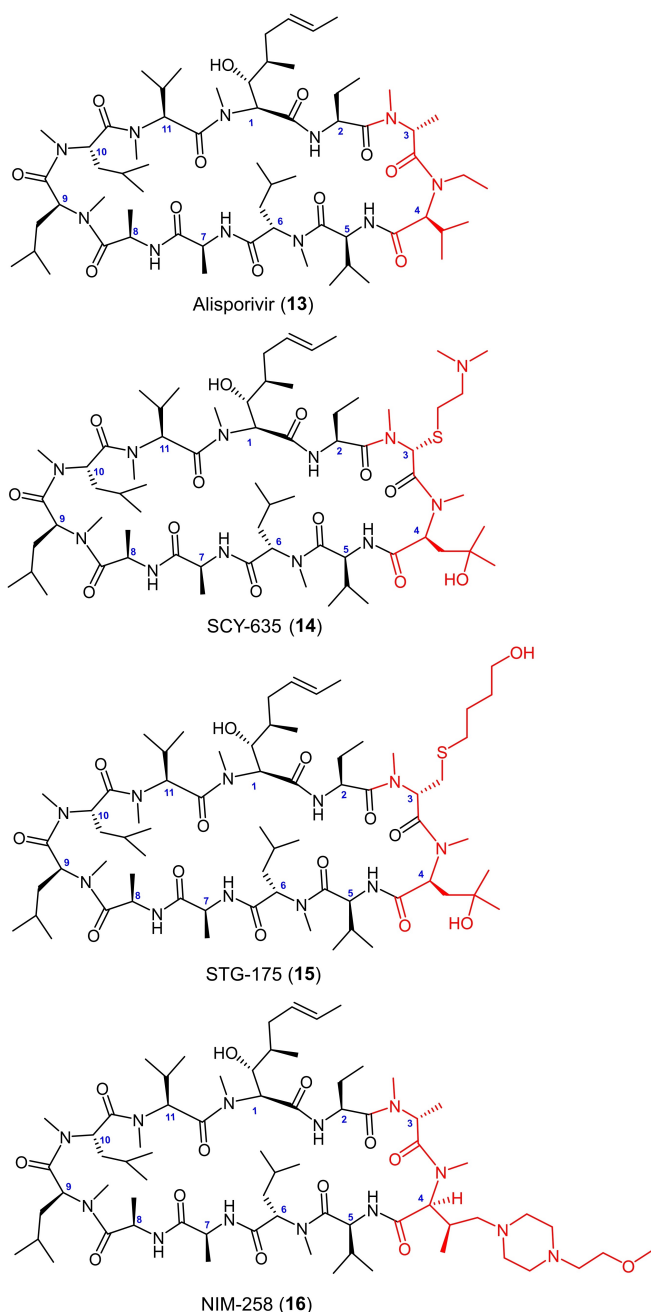
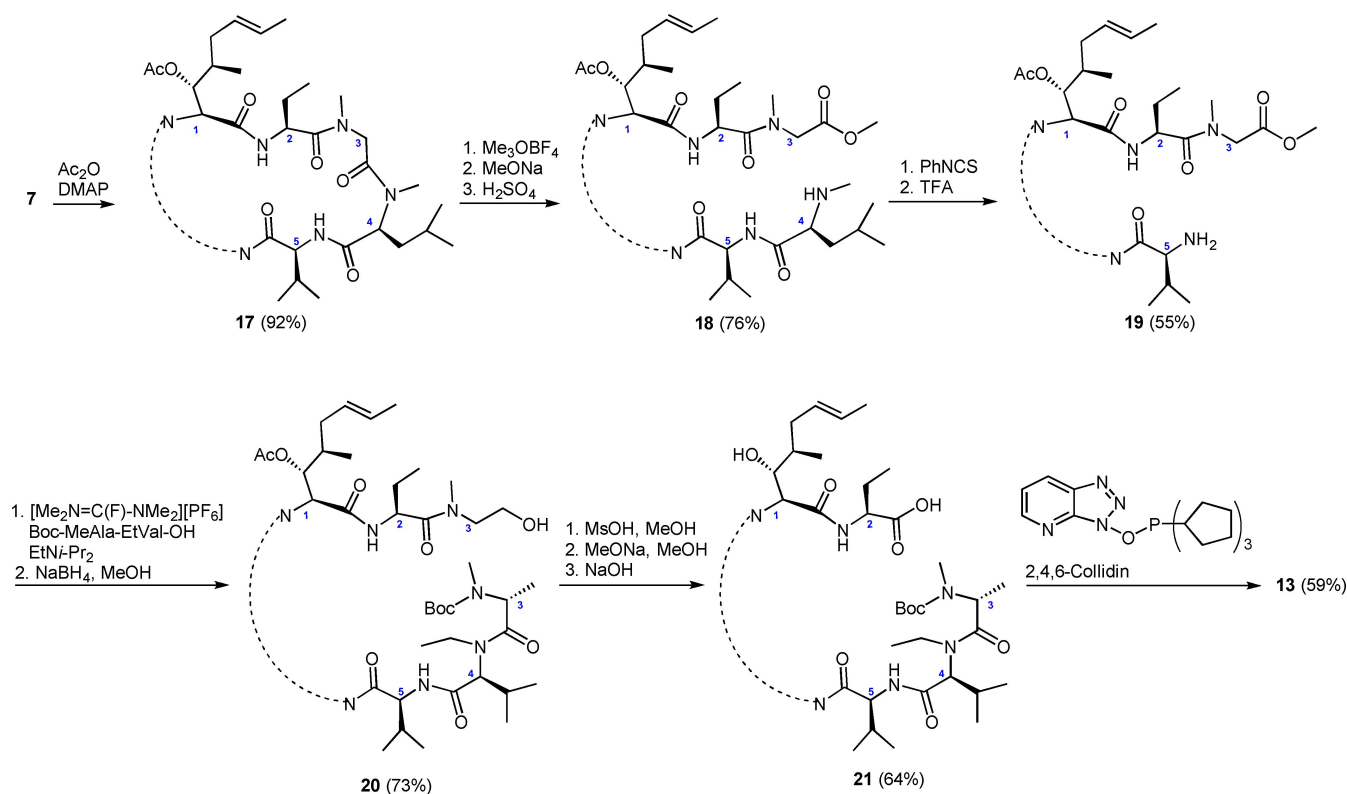


Abbildung 4. Strukturen nicht-immunsuppressiver CsA-Derivate 13–16, modifiziert in den Positionen 3 und 4.

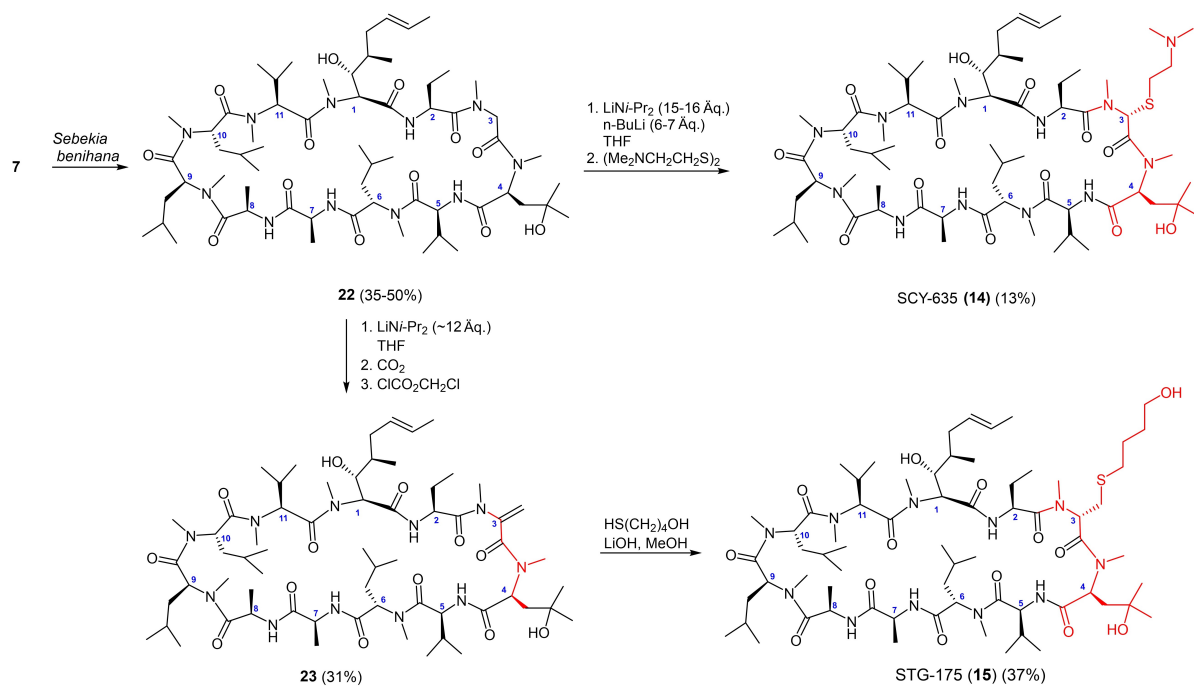
Austausch von [Sar]³ gegen [MeAla]³ ist in Alisporivir (13) der *N*-Methylleucin-Rest in Position 4 von CsA durch *N*-Ethylvalin ersetzt, während SCY-635 (14) einen *N*-Methylhydroxyleucin-Rest in Position 4 aufweist und der Sarkosin-Rest durch Dimethylaminoethylthiosarkosin ersetzt ist. Weitere, später entwickelte nicht-immunsuppressive Derivate von CsA mit modifizierten Aminosäuren in den Positionen 3 und 4 sind STG-175 (15) und NIM-258 (16). Die erstgenannte Verbindung hat mit SCY-635 das hydroxylierte *N*-Methylleucin gemeinsam, unterscheidet sich aber durch den (Hydroxybutylthio)methylsarkosin-Rest in Position 3. Das CsA-Derivat NIM-258 (16) enthält neben der [MeAla]³-Modifikation eine Substitution durch einen (2-Methoxyethyl)piperazin-Block in der Seitenkette an Position 4. Alle vier Verbindungen wurden durch Partialsynthesen aus der Stammverbindung CsA gewonnen.

Die Route zu Alisporivir (13), dem von Novartis/Debiopharm entwickelten Wirkstoff,^[58] ist in Schema 3 dargestellt. Sie beinhaltet eine Abfolge klassischer Methoden mit einem eleganten Schlüsselschritt: der selektiven Spaltung der Peptidbindung an der "Sollbruchstelle" zwischen den Aminosäureeinheiten 3 und 4. Dies wurde nach dem Schutz des sekundären Alkohols in der Alkenyl-Seitenkette durch Behandlung der Verbindung 17 mit Meerwein-Salz erreicht, das selektiv mit der einzigen α -unsubstituierten Aminosäure, Sarkosin in Position 3, reagiert. Der so gebildete Iminoether wurde unter Ringöffnung des Cyclopeptidgerüsts *in situ* in den Methylester 18 umgewandelt. Der anschließende Edman-Abbau entfernte [MeLeu]⁴ unter Bildung der Verbindung 19. Für die geplante Modifikation von CsA wurde das Dipeptid Boc-MeAla-EtVal-OH durch Kopplung über das Säurefluorid eingeführt. Die anschließende Reduktion des Methylesters lieferte Verbindung 20. Nachfolgende saure und basische Hydrolysen setzten Aminobuttersäure in Position 2 frei und spalteten den Acetatester und die Boc-Schutzgruppe ab, um die Aminosäure 21 zu erhalten. Durch intramolekulare Peptidkopplung entstand schließlich Alisporivir (13).^[58a]

Dieses Synthesekonzept wurde in der entsprechenden Abwandlung auch für die Partialsynthese von NIM-811 (11)^[43] angewandt und stellt eine Alternative zu dem oben beschriebenen Fermentationsverfahren dar. Die bei der Alisporivir-Synthese nach Schema 3 angewandte Methodik basiert auf früheren Studien über den systematischen Austausch von Aminosäureresten in *seco*-CsA, dem offenkettigen Undecapeptid. Der anschließende Aufbau des modifizierten Peptids wurde auch mittels Festphasensynthese durchgeführt.^[39] Für SCY-635 (14) wurde eine zweistufige Synthese entwickelt (Schema 4). Zunächst erfolgte eine Hydroxylierung der Leucin-Seitenkette durch eine zuvor beschriebene Biotransformation von CsA durch den Mikroorganismus *Sebekia benihana*, um Verbindung 22 zu erhalten.^[59] Anschließend wurde die Polyolithierungsmethode nach Seebach auf das Cyclopeptid 22 angewendet, einschließlich einer Deprotonierung der Hydroxygruppe [(4'OH)MeLeu]⁴. Die Enolat-Position von [MeSar]³ ist das reaktivste Nukleophil, so dass die Behandlung mit dem Disulfid (Me₂NCH₂CH₂S)₂ zur Bildung des Wirkstoffs SCY-635 (14) führte, der von Aventis Pharma veröffentlicht und



Scheme 3. Synthese von Alisporivir (**13**) ausgehend von CsA (**7**).



Scheme 4. Synthese der CsA-Derivate SCY-635 (**14**) und STG-175 (**15**).

vom Aventis-Spinoff SCYNEXIS weiterentwickelt wurde.^[60] Trotz der niedrigen Ausbeute ist die Geradlinigkeit der Synthese attraktiv. Das CsA-Derivat **22** mit dem hydroxylierten Leucinrest in Position 4 wird auch als Zwischenpro-

dukt in einer unkomplizierten Synthese von STG-175 (**15**) verwendet, wie in Schema 4 gezeigt.^[61] Hier diente das durch Polyolithierung erzeugte reaktive Enolat zur Einführung einer Methylengruppe in den $[\text{Sar}]^3$ -Rest. Dies wurde durch

Carboxylierung des Enolats und anschließende Behandlung mit Chlormethylchlorameisensäureester in einer Eintopf-Reaktion erreicht. Die so entstandene Verbindung **23** wurde für eine vinyloge Addition von 4-Mercapto-1-butanol genutzt, die diastereoselektiv erfolgte und STG-175 (**15**) ergab.

Beide Verbindungen, Alisporivir (**13**) und SCY-635 (**14**), sind potente Inhibitoren der PPIase-Aktivität von CypA mit K_i -Werten von 0.34 nM bzw. 1.8 nM.^[50b,62] Sie haben das Potenzial für ein breites Spektrum therapeutischer Anwendungen. Besonderes Augenmerk wurde auf ihre herausragenden antiviralen Eigenschaften gegen HCV und HIV gelegt, die sie zu vielversprechenden Kandidaten für die Behandlung von Virusinfektionen machen. Alisporivir (**13**) und SCY-635 (**14**) wiesen *in vitro* eine hohe Anti-HIV-1-Aktivität mit EC_{50} -Werten im nanomolaren Bereich auf,^[50b,60] jedoch zeigte die weitere Evaluierung von Alisporivir bei HIV-Patienten nur eine begrenzte Wirksamkeit der Verbindung im Gegensatz zu einer beträchtlichen Anti-HCV-Aktivität.^[63] Im Falle von HCV haben klinische Studien gezeigt, dass die Behandlung mit Alisporivir (**13**) und SCY-635 (**14**) zu einer Abnahme der viralen RNA im Plasma infizierter Patienten führt.^[64] Beide Verbindungen stören die Interaktion von CypA mit dem viralen NS5A-Protein und verhindern die virale RNA-Produktion. In Zellkultur inhibieren Alisporivir (**13**) und SCY-635 (**14**) die HCV-Replikation mit EC_{50} -Werten von 0.03 μ M bzw. 0.1 μ M.^[62,65]

Außerdem wurde festgestellt, dass Alisporivir (**13**) die Replikation des zur Gattung Flavivirus gehörenden Tickborne encephalitis-Virus in verschiedenen infizierten Zelllinien inhibiert.^[66] Für andere Flaviviren, die sich als empfindlich gegenüber CsA erwiesen haben, liegen keine Informationen über die Wirksamkeit von CsA-Derivaten vor. Eine antivirale Aktivität von Alisporivir in Zellkultur wurde auch gegen Coronaviren beschrieben. Alisporivir (**13**) inhibierte den virusinduzierten zytopathischen Effekt, der in MERS- und SARS-infizierten Zellen beobachtet wird, sowie die HCoV-NL63- und HCoV-229E-Replikation mit EC_{50} -Werten im unteren mikromolaren Bereich, je nach verwendetem Stamm und verwendeter Zelllinie.^[23b,d,67] Die relativ hohen Konzentrationen von Alisporivir, die für die Inhibierung von SARS-CoV in Zellkulturen im Vergleich zur Inhibierung von HCV erforderlich sind, könnten die Ursache für die Unwirksamkeit der Verbindung in einem Mausmodell der SARS-CoV-Infektion sein. Interessanterweise reduzierte Alisporivir (**13**) die SARS-CoV-2-Infektion in einem Vero-E6-Zellmodell dosisabhängig mit einem EC_{50} -Wert von 0.46 μ M. Daher wurde vorgeschlagen, es bei Patienten mit oder mit Risiko einer schweren Form der SARS-CoV-2-Infektion zu testen.^[68] Auch andere Krankheiten, bei denen Cyclophiline Schlüsselrollen spielen, sind auf eine mögliche Behandlung mit Alisporivir (**13**) und SCY-635 (**14**) untersucht worden. Beide Wirkstoffe inhibieren die PPIase-Aktivität des mitochondrialen Cyclophilins CypD fast so effizient wie die von CypA.^[61a] So zeigte die durch Alisporivir vermittelte Inhibierung von CypD, das an der Regulierung des Zelltods durch Kontrolle des mitochondrialen Permeabilitätsübergangs beteiligt ist, positive Wirkungen in Tiermodellen für Muskeldystrophien, durch nichtsteroidale Entzün-

dungshemmer induzierte Dünndarmgeschwüre und Ischämie-/Reperfusionsschäden.^[69] Interessanterweise wurde beschrieben, dass SCY-635 (**14**, umbenannt in WS635) bei Mäusen die durch Anästhesie/Operationen verursachte kognitive Beeinträchtigung verringert.^[70] Ähnlich wie Alisporivir (**13**) und SCY-635 (**14**) zeigt die Verbindung STG-175 (**15**) eine sehr hohe Effizienz bei der Inhibierung der PPIase-Aktivität von CypA, besitzt ein stark reduziertes immunsuppressives Potenzial und hat eine hohe Anti-HCV-Aktivität in Luciferase-Reporter-Replikon enthaltenden Zelllinien mit EC_{50} -Werten je nach HCV-Genotyp zwischen ungefähr 11 und 39 nM.^[61a]

Es wurde jedoch festgestellt, dass sowohl CsA selbst als auch Alisporivir (**13**) und andere CsA-Derivate eine unerwünschte Inhibierung verschiedener Arzneimitteltransporter wie des P-Glykoproteins, des Multidrug-Resistance-assoziierten Proteins MRP2 und des Organo-Anionen-Transporters OATP bewirken.^[71] Andererseits zeigte SCY-635 (**14**) mit dem eher hydrophilen *N*-Methylhydroxyleucin-Rest in Position 4 eine geringere Inhibierung des P-Glykoprotein-vermittelten Transports.^[62]

Die Verstärkung der Hydrophilie in der Seitenkette an Position 4 erwies sich als geeignet, die Inhibierung der Transportproteine zu verringern. Diese Beobachtungen führten zu dem CsA-Derivat **16** (NIM-258), das von der Novartis-Forschung entwickelt wurde.^[72] Die Synthesestrategie zur Gewinnung von **16** ähnelt der für Alisporivir angewandten Strategie, wie obenstehend erläutert. Die Verbindung inhibiert CypA mit 1.2 nM und zeigt in Zellkulturen eine hocheffiziente Anti-HCV-Aktivität. Bemerkenswert ist, dass sie eine geringere Transporter-inhibierung aufweist als die vorangegangenen nicht-immunsuppressiven Derivate.^[72]

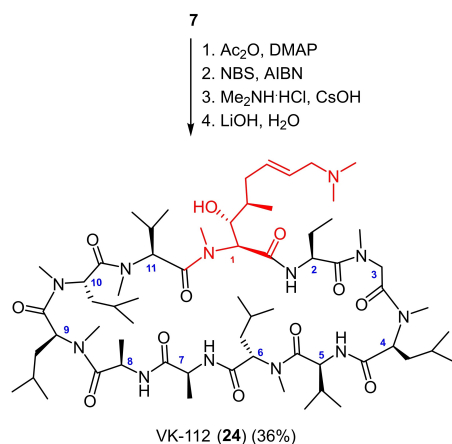
3.3. Nicht-immunsuppressive CsA-Derivate mit Modifikationen in Position 1 [MeBmt]¹

Die Seitenkette der ungewöhnlichen Aminosäure (4*R*)-4([*E*]-2-Butenyl)-4-methyl-*N*-methyl-(*L*)-threonin (MeBmt) in Position 1 ist die am besten zugängliche Position für die Synthese von CsA-Derivaten. Sie bietet gleich mehrere Angriffspunkte: Die Hydroxygruppe kann als Ester geschützt oder substituiert werden, die allylische Oxidation ermöglicht die Einführung von Heterosubstituenten in der ω -Position, die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung kann durch Olefinmetathese modifiziert oder oxidativ gespalten und der resultierende Aldehyd einer Carbonylolefinierung unterzogen werden. Viele Derivate wurden basierend auf diesen Methoden mit dem Ziel einer besseren Bioverfügbarkeit synthetisiert.^[61b,73] Erste Ansätze für CsA-Derivate mit einer modifizierten MeBmt-Seitenkette wurden von Rich und Mitarbeitern in Zusammenarbeit mit Evans und Forschern von Merck Sharp & Dhome unternommen.^[11b,74]

Obwohl sich die MeBmt-Seitenkette im "nordwestlichen" Teil von CsA befindet und an der Cyclophilin-Bindung beteiligt ist, haben CsA-Derivate mit Modifikationen an Rest 1 eine geringere immunsuppressive Aktivität ohne Verlust der Cyclophilin-Affinität gezeigt. Dieses Ver-

halten ist wahrscheinlich auf die Lage der MeBmt-Seitenkette zurückzuführen, die in der an Cyclophilin gebundenen Konformation von CsA von der Cyclophilin-Bindungsstelle weg in den CN-Bindungsbereich hineinragt (Abbildung 2, oben). Typisch für diese Konformation, die auch in polaren Lösungsmitteln eingenommen wird, ist eine Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxygruppe in der MeBmt-Seitenkette und der Carbonylgruppe der [MeLeu]⁴-Einheit.^[37]

Hier möchten wir uns auf zwei kürzlich entdeckte CsA-Derivate mit reduzierter immunsuppressiver Wirkung und erhaltener CypA-Inhibierung fokussieren: Für eine "Feinabstimmung" des Inhibierungsprofils wurde eine Reihe von Verbindungen mit relativ einfachen Modifikationen in der Seitenkette synthetisiert und biochemisch charakterisiert, nicht nur im Hinblick auf ihre Fähigkeit, im Komplex mit CypA die CN-Phosphatase-Aktivität zu unterdrücken, sondern auch auf ihre Präferenz für eine extra- oder intrazelluläre Lokalisierung.^[75] Als Hauptergebnis sticht die Verbindung **24** (VK112) hervor. Sie ist, wie in Schema 5 dargestellt,



Schema 5. Synthese von VK-112 (**24**).

durch Acylierung des sekundären Alkohols, radikalische Bromierung der endständigen Methylgruppe in der MeBmt-Seitenkette, Substitution des Broms durch Dimethylamin und anschließende Entschützung der Hydroxygruppe leicht aus CsA erhältlich. Das CsA-Derivat **24** erwies sich als nicht-immunsuppressiver, zellpenetrierender Wirkstoff mit einer 10 nM CypA-Inhibierung. Wie Alisporivir (**13**) ist auch Verbindung **24** wirksam gegen Infektionen mit den humanen Coronaviren HCoV229E und HCoV-NL63.

Ein weiterer vielversprechender Wirkstoffkandidat ist CRV-431 (früher CPI-431-32 genannt) (**28**), der neben einem modifizierten MeBmt-Rest die Einheit [MeAla]³ enthält. Die Verbindung wurde durch mehrstufige Synthesen mit herkömmlichen Methoden zugänglich gemacht.^[61b,76] Kürzlich wurde eine unkompliziertere Route publiziert (Schema 6). Sie beginnt mit einer Methylierung von [Sar]³ über polyolithiertes CsA, analog zu dem in Schema 4 beschriebenen Weg, und führt zu Verbindung **25**. Die Modifizierung der MeBmt-Seitenkette erfolgte durch Olefinmetathese und lieferte das (*E/Z*)-Gemisch von **26**. Die

Methylengruppe an der Sarkosin-Einheit wurde einer rhodiumkatalysierten Hydrierung unterzogen, die die gewünschte Konfiguration von [MeAla]³ in einem Diastereomerenverhältnis von 97:3 in Verbindung **27** ergab. Schließlich wurde die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung in der Seitenkette auf konventionelle Weise gesättigt, um zu CRV-431 (**28**) in 90 % Ausbeute über zwei Schritte zu gelangen. Der Olefinierungsschritt von CsA zum Methylensarkosin-Zwischenprodukt **25** konnte mittels Flow Chemistry unter Verbesserung der Ausbeute auf 65 % effizienter durchgeführt werden.^[77]

Es zeigte sich, dass CRV-431 (**28**) neben CypA mehrere Cyclophilin-Isoformen, nämlich CypB, CypD und CypG, wirksam inhibiert. Es hat in präklinischen Studien eine sehr starke antivirale Wirkung gegen Hepatitis C und HIV-1 gezeigt, was mit der Fähigkeit der Verbindung korreliert, die PPIase-Aktivität von CypA zu inhibieren. CRV-431 (**28**) gilt als wirksam gegen chronische Leberkrankheiten. Es hat sich in Mausmodellen für Leberfibrose und nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) als wirksam erwiesen.^[78] Interessanterweise inhibiert CRV-431 (**28**) die Replikation des Hepatitis-B-Virus über einen noch unbekanntem Mechanismus; es wird jedoch angenommen, dass diese Aktivität unabhängig von der Cyclophilin-Inhibierung ist.^[79]

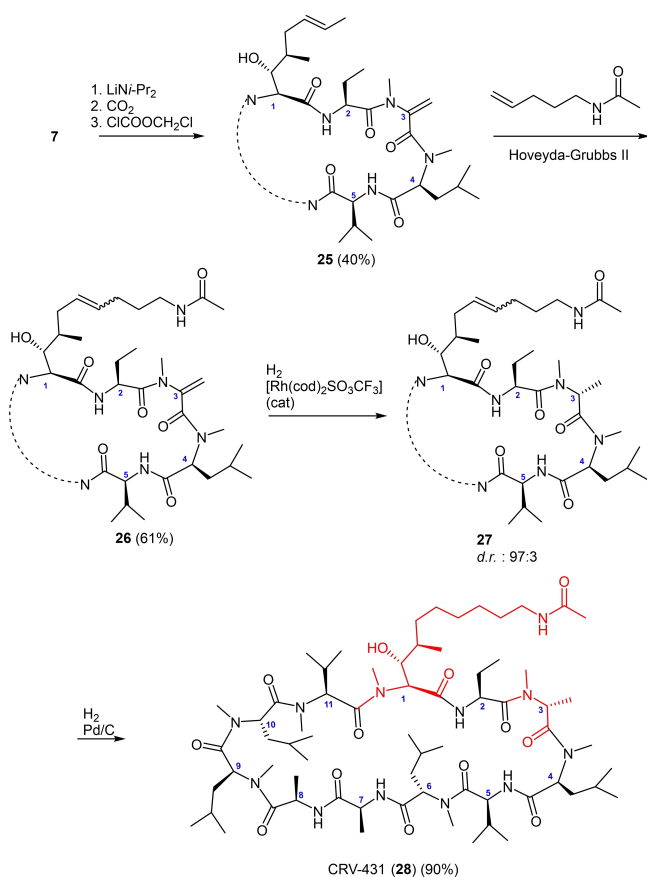
3.4. Weitere CsA-Derivate mit reduzierter Immunsuppression

3.4.1. Modifikation an [Val]⁵

CsA kann mit der Phosphazenen-Base P4-*t*-Bu und reaktiven Bromiden regiospezifisch an der NH-Gruppe von [Val]⁵ alkyliert werden. Der Austausch des Amidprotons gegen eine Benzyl- oder Allylgruppe führte zu einer stark verringerten Immunsuppression, wobei die Affinität der Verbindungen zu CypA erhalten blieb. Die verminderte Fähigkeit der Derivate, einen ternären Komplex mit CypA und CN zu bilden, könnte auf die Induktion einer Konformation von [Val]⁵ zurückzuführen sein, die ungünstig für die Bildung der Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carbonylsauerstoff des Rückgrats und N² von Trp352 der katalytischen Untereinheit von CN ist. Auch eine [MeLeu]⁴-Seitenkettenkonformation, die für die CN-Bindung nachteilig ist, könnte durch die Modifikation induziert werden.^[80]

3.4.2. Modifikation von Position 6

Im CypA-CsA-CN-Komplex stellt die Seitenkette von [MeLeu]⁶ ausgedehnte Kontakte mit drei hydrophoben Resten von CN her und ist daher für die CN-Bindung sehr wichtig. [MeAla]⁶-CsA, bei dem die Isopropylgruppe der Leucylgruppe entfernt ist, und [MeAbu]⁶-CsA haben eine ähnliche CypA-Bindungsaffinität wie CsA selbst, weisen aber eine geringere immunsuppressive Aktivität auf. Es wurde gezeigt, dass [MeAla]⁶-CsA den Neuritenauswuchs fördert.^[74c,81]



Schema 6. Synthese von CRV-431 (28).

3.4.3. Modifikation von Position 8

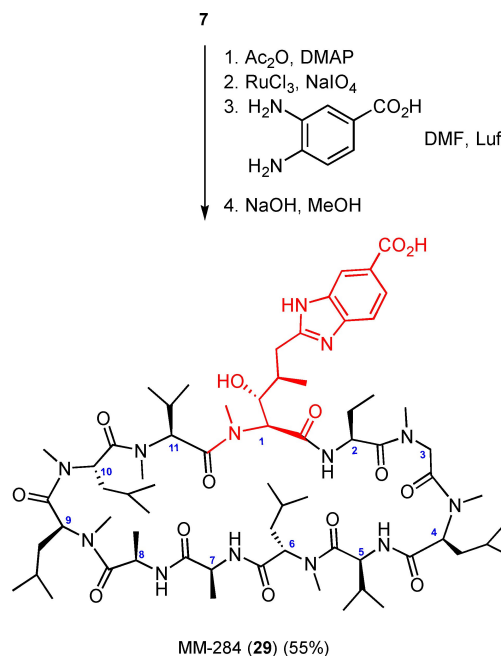
Die Aminosäure $[\text{Ala}]^8$ von CsA wurde durch (D)-N,N-Dimethyl- und N,N-Diethyllysin in einer mehrstufigen Route ersetzt, die als Schlüsselschritte eine nicht-regioselektive Umwandlung von Amid zu Thioamid in Position 7 und, dadurch induziert, eine Spaltung zwischen den Aminosäuren $[\text{L-Ala}]^7$ und $[\text{D-Ala}]^8$ beinhaltet. Die $[\text{D-Lys}]^8$ -CsA-Derivate zeigen eine vielversprechende Anti-HCV-Aktivität mit EC_{50} -Werten von weniger als 200 nM; sie sind über 50-mal weniger immunsuppressiv als CsA.^[82]

3.4.4. CsA-Derivate mit gezielter Lokalisierung

Ein CsA-Derivat, das auf den extrazellulären Raum beschränkt ist, wurde zunächst durch Anhängen einer (D-Glu)₆-Gly-OH-Einheit und eines 5(6)-Carboxytetramethylrhodamins als Fluoreszenzsonde an die Carboxygruppe von $[\text{O-Carboxymethyl D-Ser}]^8$ -CsA erhalten.^[83] Später stellte sich heraus, dass bei mehreren verschiedenen Substituenten auch eine CsA-Modifikation in Position 1 dazu führt, dass das Derivat nicht in Zellen eindringen kann. Das extrazelluläre CsA-Derivat MM-284 (29) mit einer Benzimidazol-Modifikation in Position 1 inhibiert effizient die PPIase-Aktivität von CypA mit einem K_i -Wert von 10.7 nM.^[84] Es reduziert effizient Myokard-Verletzungen bei Herzmuskel-

entzündung sowie die Apoptose von Endothelzellen bei pulmonaler arterieller Hypertonie, was auf eine Beteiligung von extrazellulärem CypA an diesen Prozessen hindeutet und die Inhibierung von extrazellulärem CypA als neuen therapeutischen Ansatz bei entzündlichen Erkrankungen nahelegt.^[85]

MM-284 (29) ist durch eine unkomplizierte Partialsynthese wie in Schema 7 gezeigt leicht erhältlich. Nach einem



Schema 7. Synthese von MM-284 (29).

Protokoll von Park und Meier^[86] wurde die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung zum Aldehyd gespalten, nachdem die Hydroxygruppe geschützt worden war. Die Kondensation des Aldehyds mit 3,4-Diaminobenzoessäure an Luft und die abschließende Entschützung des Acetats führt zu MM-284 (29) mit 55 % Gesamtausbeute.

Das mitochondriale Targeting von CsA wurde durch Konjugation des alkylgebundenen Triphenylphosphoniumkations an das CsA-Derivat mit einer 4-Methylbenzoat-Substitution in Position 3, wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, erreicht.^[44] Die resultierende Verbindung inhibiert die PPIase-Aktivität von CypA mit einem K_i -Wert von 8 nM.^[87]

Sowohl die CypA-Komplexe von MM-284 (29) als auch von dem auf die Mitochondrien gerichteten CsA zeigen eine stark reduzierte Inhibierung von CN in einem zellfreien System, was darauf hindeutet, dass ihr nicht-immunsuppressiver Charakter unabhängig von ihrer intrazellulären Lokalisierung ist. Prinzipiell können CsA-Derivate mit einer definierten zellulären Lokalisierung außerhalb des Zytoplasmas jedoch per se als nicht immunsuppressiv angesehen werden, auch wenn sie das Potenzial haben, CN zu inhibieren, da die immunsuppressive Aktivität von CsA auf der Inhibierung des zytoplasmatischen CN beruht, die den Transport von NFAT vom Zytosol zum Zellkern verhindert.^[88]

3.4.5. Bibliothek cyclischer Peptide

Obwohl sie nicht von CsA abgeleitet sind, soll hier kurz auf de novo synthetisierte cyclische Peptide hingewiesen werden, die in einer *one-bead-one-compound* (OBOC)-Bibliothek **30** erzeugt wurden (Abbildung 5). Sie bestand aus zwei

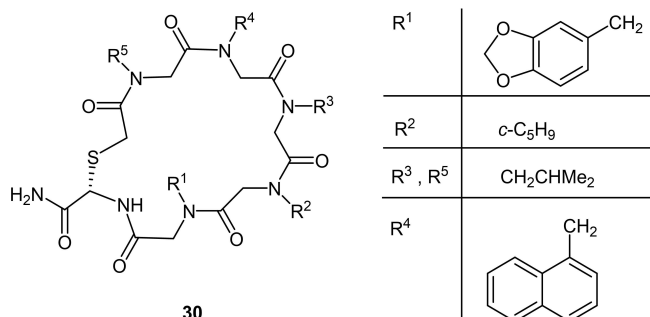


Abbildung 5. Bibliothek cyclischer Peptide **30** und Substitutionsmuster des "Treffers".

aliphatischen, zwei cyclischen und sechs aromatischen Aminen, die als Monomere dienen.

Die Studie ergab mehrere Treffer, von denen der vielversprechendste das in Abbildung 5 dargestellte Substitutionsmuster aufweist. Diese Verbindung inhibiert die CypD-vermittelte Öffnung der mPTP, wie die Erholung des mitochondrialen Membranpotenzials in Neuroblastomzellen zeigt.^[89]

4. Cyclophilin-Inhibitoren basierend auf struktureller Vereinfachungen des Makrocyclus Sanglifehrin als Leitstruktur

4.1. Struktur von Sanglifehrin A und Wirkungsweise der Cyclophilin-Inhibierung

Ein umfassendes mikrobiologisches Screening von Actinomyceten nach Cyclophilin-bindenden Metaboliten, das bei Novartis durchgeführt wurde, führte zu der Entdeckung einer neuen Klasse von Naturstoffen mit einem 22-gliedrigen Makrocyclus, der aus einer gemischten Peptid/Polyketid-Biosynthese stammt. Sie werden von *Streptomyces* sp. A92-308110 produziert und wurden nach ihren Entdeckern Sanglier und Fehr Sanglifehrine genannt. Das häufigste Mitglied der Sanglifehrin-Familie, deren Mitglieder die makrocyclische Kerneinheit gemeinsam haben, ist Sanglifehrin A (**31**).^[90] Bisher wurden drei Totalsynthesen des Naturstoffs Sanglifehrin A beschrieben.^[91,92] Darüber hinaus wurden wertvolle Synthesen von Bausteinen und methodische Studien zu Schlüsselreaktionen veröffentlicht.^[93] Sanglifehrin A (**31**) bildet Komplexe mit verschiedenen Cyclophilin-Isoformen wie CypA, CypB und CypD.^[94]

Wie CsA wirkt auch Sanglifehrin A (**31**) immunsuppressiv, allerdings über einen anderen, noch unbekanntem mole-

kularen Mechanismus. Es wurde gezeigt, dass im Gegensatz zu CsA, seine immunsuppressive Wirkung unabhängig von der Komplexbildung mit CypA ist, da die kompetitive Verdrängung der Verbindung die Immunsuppression nicht beeinträchtigt und keine Inhibierung der Phosphatase-Aktivität von CN beinhaltet.^[95] Andererseits wurde die Bildung eines ternären Komplexes zwischen CypA, Sanglifehrin A (**31**) und Inosin-5'-monophosphat-Dehydrogenase 2 (IMPDH2) beobachtet, was auf eine mögliche Beteiligung dieses Komplexes an der Immunsuppression hindeutet.^[96]

Sanglifehrin A (**31**) inhibiert die PPIase-Aktivität von CypA mit einem IC₅₀-Wert von 12,8 nM.^[95a] Wie CsA bindet auch Sanglifehrin A (**34**) an das aktive Zentrum des Cyclophilins, wie aus einer Kristallstruktur des Komplexes zwischen CypA und Sanglifehrin A hervorgeht.^[97] Die direkte Wechselwirkung zwischen Sanglifehrin A und CypA beruht auf sechs intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen, die auf ein relativ kleines Fragment von Sanglifehrin, den Tripeptidteil (Val-meta-Tyr-Pip) im makrocyclischen Teil des Moleküls, wie auch in Abbildung 6 dargestellt, gerichtet

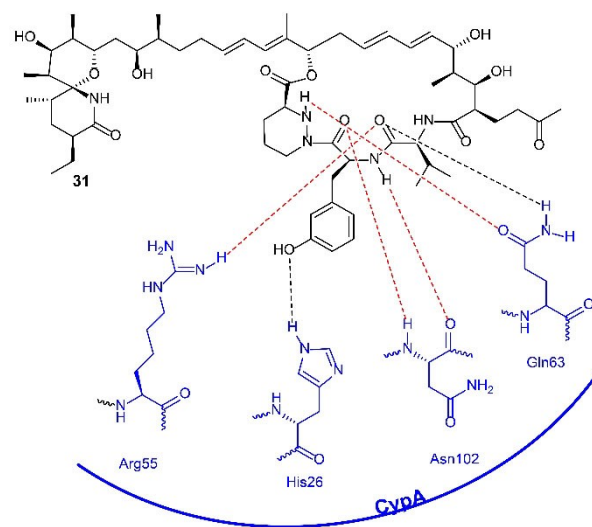
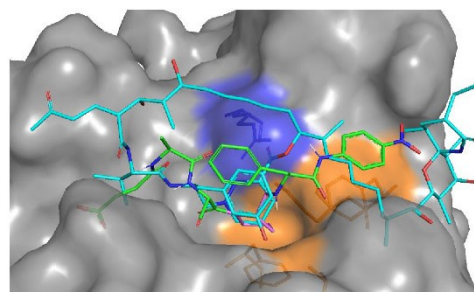
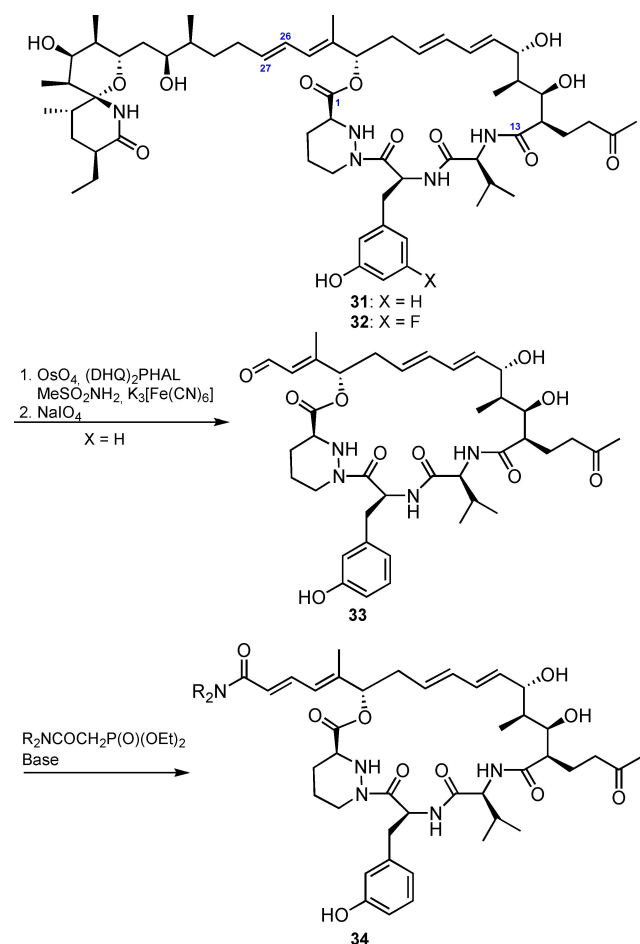


Abbildung 6. Überlagerung von CypA-Komplexen mit dem Substrat Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-Nitroanilid (grün, PDB ID: 1RMH)^[35] mit dem Pro-Rest in Rosa und Sanglifehrin A (**31**) (cyan, PDB ID: 1YND)^[97] im aktiven Zentrum der PPIase. Hervorgehoben ist die Oberfläche von Arg55 (blau) und Phe60, Met61, Phe113 und Leu122 in Orange (oben). Sanglifehrin A (**31**) (schwarz) und Wasserstoffbindungen (rot) zu CypA (blau) gemäß Lit. [97] (unten).

sind. Die Überlagerung von CypA-Komplexen mit dem Substrat Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-Nitroanilid und Sanglifehrin A im aktiven Zentrum der PPIase zeigt, dass der Piperazinsäurerest von Sanglifehrin A die von Phe60, Met61, Phe113 und Leu122 gebildete hydrophobe Tasche von Cyclophilin A besetzt, in der sich der Prolinring des Substrats und der [MeVal]¹¹-Rest von CsA befinden.

Die geringe orale Bioverfügbarkeit und die geringe Löslichkeit haben die Anwendung der Verbindung in biologischen Systemen erschwert.

Es überrascht nicht, dass sich die Bemühungen um nicht-immunsuppressive Analoga von Sanglifehrin auf diese in einen Makrocyclus eingebettete Peptidsequenz konzentrierten, während die Peripherie des Naturstoffs modifiziert, vereinfacht oder ausgespart wurde, da sie als weniger wichtig für die Interaktion mit Cyclophilinen angesehen wird. Ein Beweis für diese Hypothese wurde durch eine frühe Abbaustudie von Sanglifehrin A erbracht: Aldehyd **33** (siehe Schema 8), dem der komplexe spirobicyclische Teil,



Schema 8. Synthese von Sangamiden **34**, abgeleitet von Sanglifehrin **31**.

die "westliche Region" des Naturstoffs, fehlt, zeigt eine Inhibition von CypA mit einem IC₅₀-Wert von ungefähr 30 nM.^[95b] Basierend auf diesen Beobachtungen wurden

zwei Synthesestrategien verfolgt, um nicht-immunsuppressive Wirkstoffe zu erhalten: erstens die Modifizierung von Fermentationsprodukten und zweitens die De-novo-Synthese von Substanzen, deren Strukturen vom Naturstoff Sanglifehrin A (**31**) inspiriert, aber nicht von ihm abgeleitet sind.

4.2. Mittels Partialsynthese aus Sanglifehrinen hergestellte nicht-immunsuppressive Wirkstoffe

Der Abbau der Seitenkette und die anschließende Modifizierung eröffneten einen Weg hin zu den ersten nicht-immunsuppressiven Derivaten von Sanglifehrin, den sogenannten Sangamiden, die von Biotica Technology und kooperierenden Forschungsgruppen entwickelt wurden. Die unkomplizierte Partialsynthese ist in Schema 8 dargestellt.^[98] Die Anwendung des asymmetrischen Dihydroxylierungsverfahrens von Sharpless im ersten Schritt erfolgte vollständig selektiv an der C26-C27-Doppelbindung. Die darauf folgende Glykolspaltung lieferte den Aldehyd **33** mit 63 % Gesamtausbeute.^[99] Die anschließende Horner-Wadsworth-Emmons-Olefinierung führte zu Dienamiden **34** mit verschiedenen Substitutionsmustern am Amidstickstoff in der Seitenkette.

Ein vielversprechender Wirkstoffkandidat aus der Sangamidfamilie ist NV-556, ehemals bekannt als NVP018 und BC556 (**35**) (Abbildung 7), der von NeuroVive Pharmaceu-

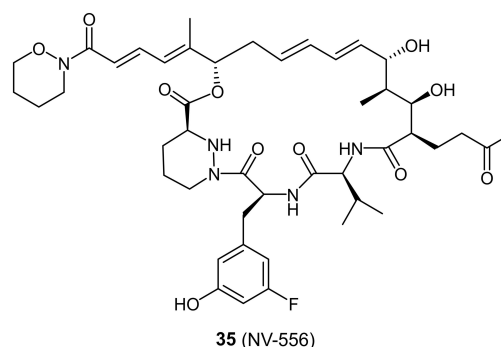


Abbildung 7. Struktur des nicht-immunsuppressiven Sangamids NV-556 (**35**).

tical AB weiter bearbeitet wurde, als dieses Unternehmen das Cyclophilin-Inhibitor-Programm von Biotica erworben hatte.^[100] Auch hier wurde die westliche Region von Sanglifehrin gekappt und durch eine 1-(Tetrahydro-2*H*-1,2-oxazin-2-yl)-Endgruppe ersetzt, mit einer zusätzlichen Fluorsubstitution in der aromatischen Aminosäuregruppe. Die Synthese von NV-556 beginnt mit dem fluorierten ("mutasynthetischen") Sanglifehrin **32**, wie in Schema 8 gezeigt.^[101] Diese Verbindung ist durch Fermentation des biotechnologisch hergestellten Stammes *Streptomyces* sp. BIOT4585 leicht verfügbar.^[102] Zur Herstellung des fluorierten Sanglifehrin **32** ist eine Fütterung mit Methyl-(*S*)-2-amino-3-(3-fluor-5-hydroxyphenyl)propanoat und *rac*-Piperazinsäure erforder-

lich. Anschließend führt die Anwendung des in Schema 8 beschriebenen dreistufigen Protokolls zu **35** (NV-556).

Die antivirale Wirkung von NV-556 (**35**) gegen HIV-1 und HCV wurde *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen.^[102,103] Darüber hinaus wurde NV-556 (**35**) als potenziell antifibrotische Verbindung bei Leberfibrose untersucht^[104] und es wurde festgestellt, dass sie die Fibrose und die Entwicklung von Leberzellkarzinomen bei Mäusen mit NASH reduziert.^[105] Ein weiterer Vorteil von NV-556 (**35**) besteht darin, dass es nur eine minimale Inhibierung von Arzneimitteltransportern aufweist.^[102]

4.3. Nicht-immunsuppressive synthetische Sanglifehrin-inspirierte Wirkstoffe

In den letzten Jahren verfolgten Forschergruppen von Gilead, Selcia und Cypralis das Ziel, niedermolekulare Cyclophilin-Inhibitoren zu entwickeln, deren Strukturen von Sanglifehrin inspiriert waren.^[106] Eine rigorose Vereinfachung des Naturstoffs sollte es jedoch ermöglichen, die Wirkstoffe ausschließlich durch chemische Totalsynthese zu gewinnen. Ziel des Forschungsprogramms war die Entwicklung oral bioverfügbarer, antiviraler Arzneimittel. Dazu wurde der "südliche Teil" mit dem Peptidskelett, einschließlich der Piperazinamideinheit, beibehalten, wohingegen es einen relativ großen Freiheitsgrad bei der Konstruktion des "nördlichen Teils" gab. In einem ersten Vorstoß^[106b] wurde, neben anderen Vereinfachungen, das C18-C21-Dien von Sanglifehrin durch eine Styroleinheit ersetzt, um das Derivat **36** zu erhalten. Kristallstrukturanalysen im Komplex mit CypA ergaben eine π - π -Wechselwirkung dieser Styroleinheit mit der Guanidiniumgruppe von Arg55 im aktiven Zentrum von CypA als neuen Bindungsmodus, wie in Abbildung 8

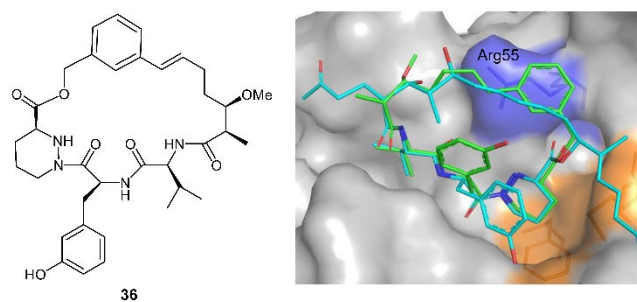


Abbildung 8. Struktur des "vereinfachten Sanglifehrins" **36** (links) und π - π -Wechselwirkung der Styroleinheit von **36** (grün) mit der Guanidiniumgruppe von Arg55 in CypA (rechts). Überlagerung von CypA-Komplexen mit **36** (grün, PDB ID: 5T9Z)^[106b] und Sanglifehrin A (cyan, PDB ID: 1YND)^[97] im aktiven Zentrum der PPIase. Hervorgehoben ist die Oberfläche von Arg55 in Blau und Phe60, Met61, Phe113 und Leu122 in Orange.

dargestellt. Da sich herausstellte, dass der *m*-Tyrosin-Rest in das Lösungsmittel verlagert wurde, wurde diese Aminosäure, die nicht essentiell für die CypA-Inhibierung angesehen wird, durch Alanin ersetzt, was den Vorteil eines geringeren Molekulargewichts mit sich bringt.

Diese Ergebnisse führten zu den neuartigen synthetischen 22-gliedrigen Makrocyclen **37** und **38** als neue Leitverbindungen (Abbildung 9). In einem zeitaufgelösten bioche-

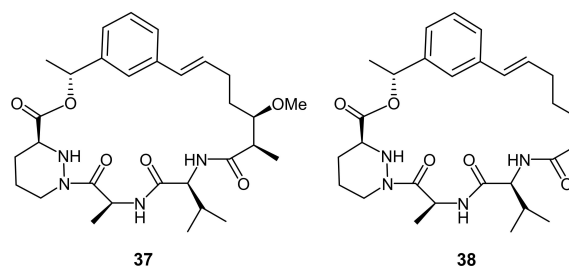


Abbildung 9. Strukturen der CypA-Inhibitoren **37** und **38** mit einer weiteren Vereinfachung von Sanglifehrin mit einer Styrolgruppe im "nördlichen Teil".

mischen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Assay zeigen sie eine Affinität zu CypA von $K_d = 24$ nM bzw. 48 nM.^[106b]

Trotz dieser starken CypA-Inhibierung und der moderaten Anti-HCV-Aktivität wurde die Pharmakokinetik als schlecht bewertet. Daher verfolgten die kooperierenden Forschungsgruppen einen zweiten Ansatz, der durch schrittweise Veränderung und Modifizierung der Leitstruktur **36** zur Verbindung **40** führte. In einer ersten Entwicklungsphase wurde die Styrolkomponente durch einen Isochinolin- und dann durch einen Chinolinblock ersetzt und die Größe des Makrocyclus von 22 auf 21 Glieder reduziert. Die in Abbildung 10 gezeigten Verbindungen **39a** und **39b** können

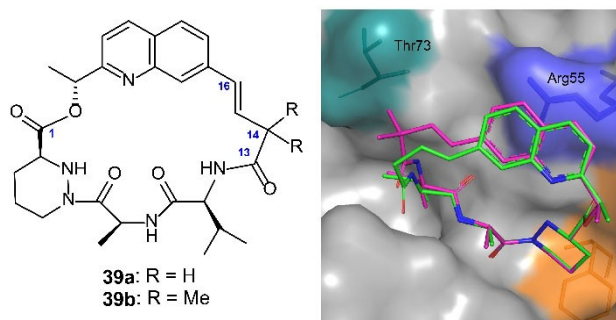


Abbildung 10. Strukturen der Verbindungen **39** (links) und Überlagerung der Verbindung **39a** (grün) und des Homologen **39b** (violett) in Komplexen mit CypA,^[106c] die zeigen, dass die Positionierung der C13-C16-Atome näher an der Proteinoberfläche ist und die C14-*pro-R*-Methylgruppe eine lipophile Wechselwirkung mit Thr73 ausbildet. Hervorgehoben ist die Oberfläche von Arg55 in Blau, Phe60, Met61, Phe113 und Leu122 in Orange und Thr73 in Cyan (rechts). Die Daten wurden freundlicherweise von T. C. Appleby zur Verfügung gestellt.

als repräsentative Beispiele mit einer verbesserten Bindungsaffinität dienen. Ihre Kristallstrukturen im Komplex mit CypA zeigen, dass das Chinolin die Bindung zu Arg55 aufrechterhält. Darüber hinaus bildet die *pro-R* der diastereotopen C14-Methylgruppen im geminal disubstituierten

Derivat **39b** eine lipophile Wechselwirkung mit dem Thr73-Rest.^[106c]

In einem zweiten Optimierungsversuch wurden die funktionellen Gruppen an C-1 und C-13, Lacton bzw. Lactam, vertauscht, was zur Bildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke zwischen Lactam an C-1 und dem Chinolin-Stickstoffatom in Verbindung **40** führte (Abbildung 11).

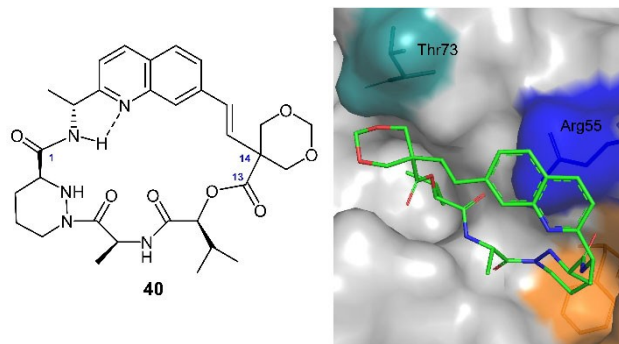
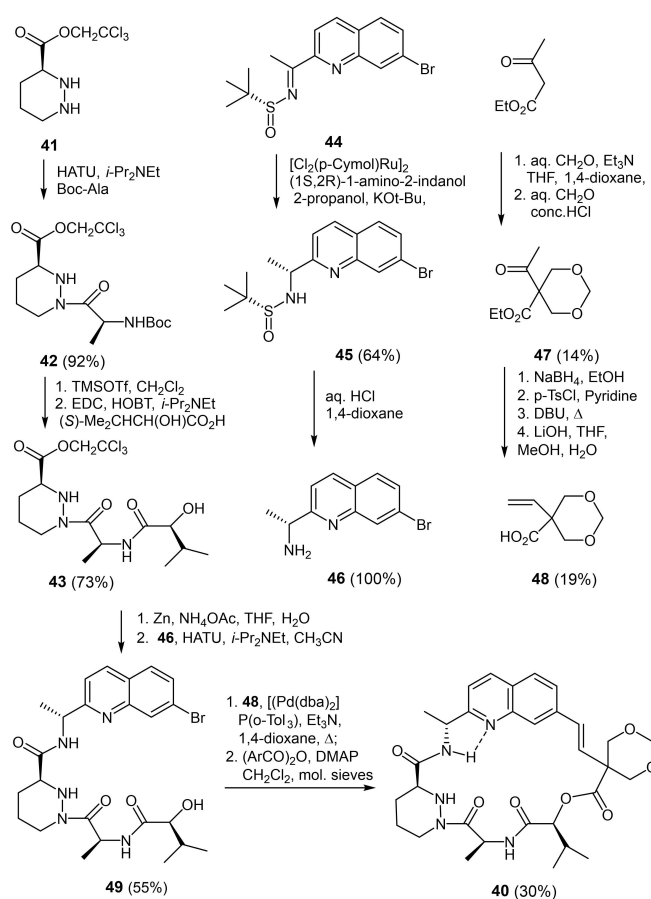


Abbildung 11. Struktur des optimierten nicht-immunsuppressiven Inhibitors **40** (links) und Ansicht der an CypA gebundenen Verbindung **40**.^[106c] Hervorgehoben ist die Oberfläche von Arg55 in Blau, Phe60, Met61, Phe113 und Leu122 in Orange und Thr73 in Cyan (rechts). Die Daten wurden freundlicherweise von T. C. Appley zur Verfügung gestellt.

Diese Eigenschaft führte zu einer wesentlich verbesserten Membranpermeabilität – ein wichtiger Schritt zur gewünschten oralen Anwendung. Schließlich wurde Position 14 durch Einführung einer 1,3-Dioxan-Gruppe in ein Spirozentrum umgewandelt. Diese Modifikation führte zu einem niedrigeren Verteilungskoeffizienten, verringerte den oxidativen Metabolismus und die Pregnan-X(PXR)-Aktivierung, die als Maß für die Wechselwirkung zwischen Arzneimitteln gilt.

Die Verbindungen **36–40** und eine Vielzahl von Analoga und Derivaten wurden durch Totalsynthesen gewonnen. Im Folgenden wird die hochgradig konvergente Route zu Verbindung **40** beschrieben, die in diastereomeren- und enantiomerenreiner Form synthetisiert wurde, wie in Schema 9 gezeigt, wobei die drei Bausteine **43**, **46** und **48** als Schlüsselintermediate dienen.^[106c] Der erste der drei parallelen Syntheseweige begann mit dem Trichloracetat der (*S*)-Piperazinsäure **41**.^[93a] Zuvor war eine asymmetrische Synthese der Säure selbst entwickelt worden, die auf einer diastereoselektiven Hydrazinierung eines Evans'-Oxazolidinons basierte.^[107] In jüngerer Zeit wurde eine biotechnologische Route zu enantiomerenreiner Piperazinsäure mit transgenen Mikroorganismen eröffnet.^[108]

Der Ester **41** wurde regioselectiv mit Boc-geschütztem Alanin gekoppelt, um das Amid **42** zu erhalten, wie in einer früheren Arbeit veröffentlicht.^[106b] Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe und die Standardpeptidkopplung mit (*S*)-2-Hydroxy-3-methylbutansäure führten zum ersten Baustein **43** als reinem Stereoisomer. Um das zweite Schlüsselintermediat, das Amin **46**, zu erhalten, wurde eine doppelte Stereodifferenzierungsmethode^[109] angewandt, die einerseits



Schema 9. Synthese des Cyclophilin-Inhibitors **40**. HATU = O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat; EDC = 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino)propyl-carbodiimid; HOBT = 1-Hydroxybenzotriazol; (ArCO)₂O = 2-Methyl-6-nitrobenzoesäureanhydrid.

auf dem chiralen Substrat **44** und andererseits auf einem chiralen Liganden im Hydrierungskatalysator basiert. So wurde nach einem von Guijarro, Pablo und Yus beschriebenen Protokoll^[110] das aus 7-Brom-2-acetylchinolin und (*R*)-*t*-Butylsulfonamid hergestellte Sulfinimin (*R*)-**44** vom Davis-Ellman-Typ^[111] einer rhodiumkatalysierten Transferhydrierung mit (1*S*,2*R*)-1-Amino-2-indanol unterzogen. Wie die spanischen Forscher beobachteten, führte die Kombination dieses Enantiomers des Liganden am Edelmetall mit (*R*)-Sulfinimin **44** zu einer Matched-Pair-Situation, die zu Sulfonylamid **45** mit optimaler Diastereoselektivität führte. Die saure Spaltung der Stickstoff-Schwefel-Bindung lieferte Chinolin **46**, den zweiten Baustein. Der dritte Baustein, das achirale Dioxan **48**, wurde nach Standardvorschriften aus Acetessigester über Dioxanylketoester **47** gewonnen. Die geringe Ausbeute bei dieser Sequenz ist vertretbar, wenn man bedenkt, dass es sich bei allen benötigten Substanzen um Bulk-Chemikalien handelt.

Die drei Bausteine wurden in einer vierstufigen Sequenz kombiniert, beginnend mit der Abspaltung des Trichlorethylesters im Zwischenprodukt **43**. Die so freigesetzte Carbonsäure wurde mit dem zweiten Baustein, 2-Aminoethylchinolin **46**, zum Tripeptid **49** gekoppelt. Anschließend

wurde durch eine Heck-Reaktion das Dioxan **48** eingebaut. Der letzte Schritt, die Schließung des Makrocyclus, wurde durch Makrolactonisierung unter Anwendung von Shiina-Bedingungen^[112] in hoher Verdünnung erreicht. Im Endeffekt ergab die Verknüpfung der Bausteine mit einer nicht optimierten Ausbeute von 17 % ausgehend von Verbindung **41** das Endprodukt **40** im Gramm-Maßstab; ein Upscaling auf 100 bis 1000 g ist angekündigt.

Die von Sanglifehrin inspirierte, aber wesentlich vereinfachte Verbindung **40** zeigt eine starke CypA-Inhibierung ($K_d=5$ nM), eine bemerkenswerte Anti-HCV-2a-Aktivität ($EC_{50}=98$ nM) und eine hohe orale Bioverfügbarkeit bei Ratten (100 %) und Hunden (55 %).^[106c] Kürzlich wurde die Verbindung **39b** (Abbildung 10) in einer Studie verwendet, die zeigte, dass HCV das CypA nutzt, um die Effektor-Proteinkinase R (PKR) zu umgehen.^[113]

Angesichts des enormen Aufwands, der für die Synthese einer großen Anzahl von Verbindungen, die eine Cyclophilin-Inhibierung aufweisen, erforderlich ist, stellt sich die Frage, ob dieser Prozess durch Vorhersage der entsprechenden Strukturen auf der Grundlage theoretischer Berechnungen erleichtert und vereinfacht werden kann. In der Tat wurde dieser Ansatz im Rahmen einer gemeinsamen Forschungsarbeit von Gilead und Schrödinger unter Verwendung des Free-Energy-Perturbation (FEP)-Verfahrens (FEP+) verfolgt.^[114] Für mehr als zwei Dutzend Verbindungen der Serien **36–40** und deren Analoga wurden die Bindungsaffinitäten zu CypA berechnet und mit 10 synthetisch verfügbaren Verbindungen verglichen, deren Bindungsaffinitäten durch einen kompetitiven Bindungstest, der auf zeitaufgelöstem Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (TR-FRET) beruht, bestimmt worden waren. Die Übereinstimmung der berechneten mit den zuvor ermittelten experimentellen Daten wurde in dieser "retrospektiven Studie" als gut befunden,^[114] und die Berechnungen können bei der Entwicklung verbesserter nicht-immunsuppressiver CypA-Inhibitoren mit makrocyclischen Strukturen, die mit Verbindung **40** verwandt sind, helfen.

5. De novo entworfene niedermolekulare Verbindungen als nicht-immunsuppressive Cyclophilin-Inhibitoren

5.1. Arylindanyl- und Biarylindanylketone

Ein dritter Ansatz für nicht-immunsuppressive Cyclophilin-Inhibitoren basiert auf de novo entworfenen und entsprechend synthetisierten niedermolekularen Verbindungen (*small molecules*). Ihre Strukturen sind nicht von Naturstoffen inspiriert oder abgeleitet, sondern intuitiv, rational oder virtuell unter Berücksichtigung hypothetischer oder rechnerisch modellierter Bindungsmodi am aktiven Zentrum des Enzyms entworfen.

In unseren Forschungsgruppen haben wir Arylindanylketone entwickelt, ursprünglich als Inhibitoren der PPIase-Aktivität des menschlichen Parvulins Pin1,^[115] das ein Target für die Entwicklung neuer Krebsmedikamente darstellt.^[116]

Wir ließen uns von der Idee leiten, dass Arylindanylketone und Biarylindanylketone den Übergangszustand **3** (Abbildung 12) der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung und

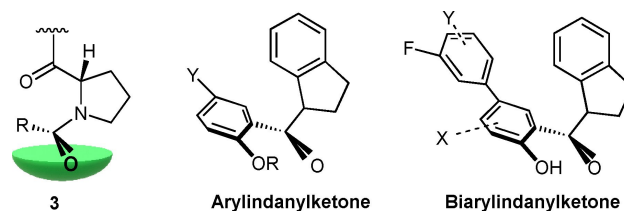


Abbildung 12. Arylindanyl- und Biarylindanylketone, die den hypothetischen enzymatischen PPIase-Übergangszustand **3** nachahmen (vgl. Schema 1).^[115a]

der mit ihr einhergehenden Änderung der Hybridisierung nachahmen. Von dem Übergangszustand kann angenommen werden, dass er eine verdrillte Amidbindung enthält (vgl. Schema 1).^[115a]

Durch einfache Synthesen konnten wir^[115a,117] eine Reihe von Arylindanyl- und Biarylindanylketonen erhalten, von denen eine Auswahl in Abbildung 13 dargestellt ist: enantiomerenreine Arylindanylketone (*R*)- und (*S*)-**50**, hergestellt aus dem entsprechenden Enantiomer der 1-Methyl-1-indancarbonsäure,^[118] und racemische Biarylindanylketone. Auf der Grundlage einer dynamisch-kinetischen Racematspaltung der Indancarbonsäure^[119] erhielten wir das Keton (*R*)-**51a** (OMe statt OH) in 94 % *ee*.^[118] Auf den ersten Blick scheint es vernünftig, diese Substanz ebenso wie eine racemische Probe den In-vitro-Inhibitionstests zu unterziehen. Wir stellten jedoch fest, dass es unter diesen Bedingungen leicht zu einer Racemisierung des enantiomerenangereicherten Ketons durch Enolisierung kommt.^[120] Eine Kristallstrukturanalyse des Derivats **51a** zeigt, dass die Biaryl-Carbonyl- und die Indanyl-Ebene nahezu senkrecht zueinander stehen, so dass die Verbindungen dieser Reihe in gewisser Weise die Anforderungen an eine Nachahmung des hypothetischen Übergangszustands eines verdrillten Amids **3** erfüllen.

In einem proteasefreien PPIase-Assay mit Succinyl-Ala-Glu-Pro-Phe-*p*-Nitroanilid als Substrat^[14b] wurde die Inhibierung von humanem Pin1 durch Aryl- und Biarylindanylketone bestimmt. Ausgewählte Ergebnisse sind in Abbildung 13 zusammen mit den Strukturen dargestellt. Die Ketone **51** und **54** sind aktive Inhibitoren mit K_i -Werten im einstelligen mikromolaren Bereich. Die Substitution der phenolischen Ketone durch Nitro- oder Aminoreste führte bei den Verbindungen **52** und **53** zu einer Steigerung der Aktivität auf submikromolare Werte. Das Biotin-Derivat **54** diente zum Nachweis der reversiblen Inhibierung durch einen geeigneten Streptavidin-Test.^[115a]

Arylindanylketone (*R*)- und (*S*)-**50** mit einem konfigurationsstabilen stereogenen Zentrum wurden ausgewählt, um den Einfluss der Enantiomerie auf die PPIase-Aktivität zu untersuchen. Die K_i -Werte, die mit den chemischen Strukturen in Abbildung 13 dargestellt sind, zeigen, dass sich die Inhibierungsaktivität der Enantiomere um eine Größenord-

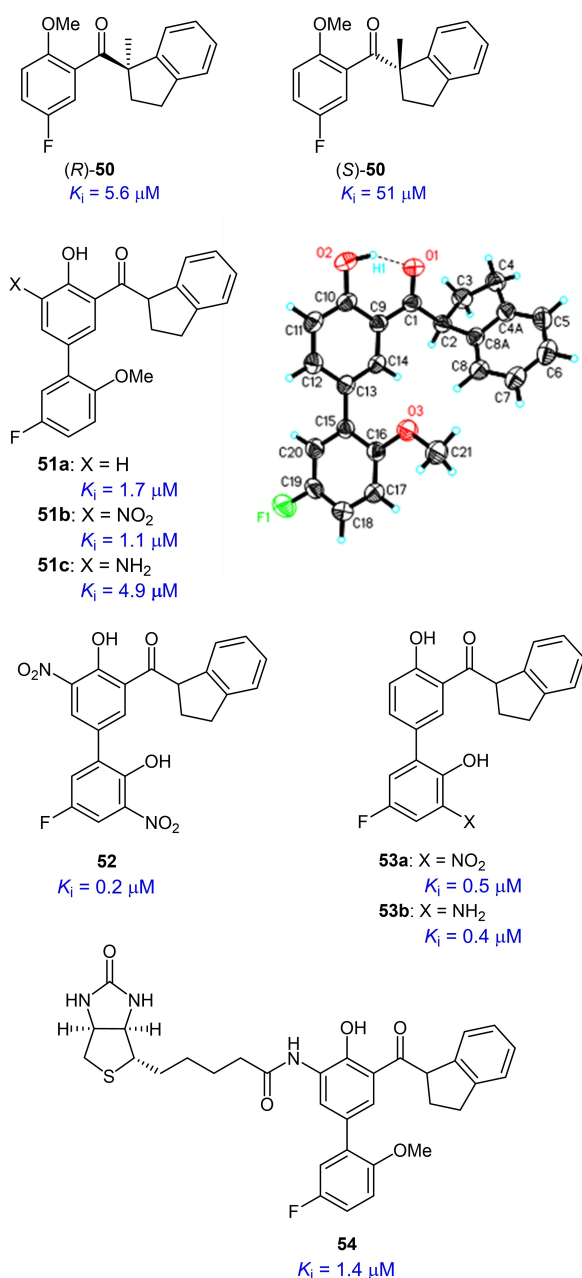


Abbildung 13. Ausgewählte Arylindanyl- und Biarylindanylketone **50–54** mit ihren K_i -Werten der Pin1-Inhibition. Kristallstruktur von Verbindung **51 a**.

nung voneinander unterscheidet, wobei das (*R*)-Enantiomer von **50** die aktivere Verbindung ist. Die unterschiedliche Aktivität der enantiomeren Ketone (*R*)- und (*S*)-**50** wurde darüber hinaus auch in Zellen durch zwei Experimente nachgewiesen: durch einen Luciferase-Reportergenassay mit einem p53-sensitiven Promotorelement in Zellen der Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 sowie durch Untersuchung der Wirkung auf den onkogenen Transkriptionsaktivator β -Catenin. Auch hier war das (*R*)-Enantiomer von Keton **50** aktiver als (*S*)- und *rac*-**50**.^[115a]

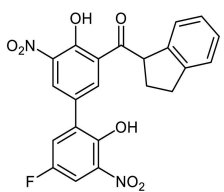
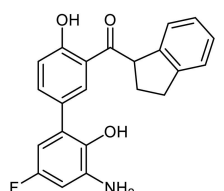
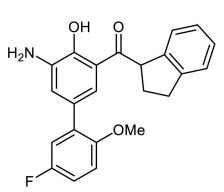
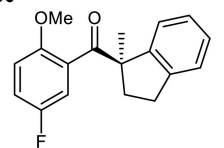
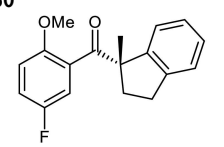
Nachdem gezeigt worden war, dass Arylindanyl- und Biarylindanylketone die PPIase-Aktivität des humanen Pin1

inhibieren können, begannen wir zu untersuchen, ob die Inhibition auch bei Cyclophilinen auftritt. Tatsächlich wurde eine recht gute Bindung an CypA beobachtet, wie in Tabelle 1 für ausgewählte Verbindungen gezeigt wird, mit Inhibierungskonstanten im einstelligen bis submikromolaren Bereich (Spalte 3). Noch bemerkenswerter ist, dass diese niedermolekularen Verbindungen eine ausgeprägte Selektivität gegenüber den verschiedenen Cyclophilin-Isoformen aufweisen, die eine klare Bevorzugung zugunsten von CypA im Vergleich zu CypB zeigen (Spalte 3 vs. 4). Dies gilt insbesondere für Biarylindanyl-Ketone (Einträge 1–3), aber in geringerem Maße auch für das (*R*)-Enantiomer von Keton **50**, während (*S*)-**50** gegenüber beiden Isoformen inaktiv ist (Einträge 4 und 5). Die höchste Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen CypA und CypB um einen Faktor von >200 weist das dinitrosubstituierte Bisphenol **52** auf. Angesichts der Einfachheit seiner molekularen Struktur einerseits und des hohen Maßes an Homologie zwischen CypA und CypB (63 % identische Aminosäuren) in der PPIase-Domäne andererseits erscheint dieser Grad an Selektivität überraschend. Ein Beweis für diese Selektivität *in vivo* wurde durch die Inhibition der CypA-, aber nicht der CypB-vermittelten Chemotaxis von CD4+T-Zellen der Maus durch **52** erbracht.^[121]

Um einen theoriebasierten Einblick in die Inhibition von Cyclophilin durch niedermolekulare Verbindungen zu erhalten, führten Sambasivarao und Acevedo Berechnungen mittels statistischem Monte-Carlo-Sampling in Verbindung mit der Free-Energy-Perturbation-Methode (MC/FEP) durch und legten dabei besonderen Wert auf die Aufklärung des Ursprungs der oben erwähnten isoformspezifischen Inhibition durch Arylindanylketone.^[122] Die berechneten Bindungsenergien der Verbindungen **51c**, **52**, **53b** sowie (*R*)- und (*S*)-**50** stimmten gut mit den von uns experimentell ermittelten Daten überein.^[121] Für die hochselektive Verbindung **52** ermittelten die Berechnungen den günstigsten Bindungsmodus in CypA und CypB, der sich in der Ausrichtung des Indanylrests deutlich unterscheidet. Die Bindungsmodi sind in Abbildung 14 (oben) mit einer Überlagerung der CypA- und CypB-Bindungsstellen dargestellt. Im günstigen CypA-Komplex zeigt der Indanylrest in eine polare Region des Enzyms mit einer nicht-kovalenten Bindung der Carbonylgruppe an His54. Eine weitere schwache elektrostatische Wechselwirkung besteht zwischen der Guanidiniumgruppe von Arg55 von CypA und dem Sauerstoffatom des Nitrosubstituenten (*meta* zur Carbonylgruppe) von Keton **52** (Abbildung 14, unten). Die berechnete Gesamtenergie dieser kombinierten Coulomb- und Van-der-Waals-Wechselwirkung beträgt $-16.3 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Die deutlich unterschiedliche Inhibitorwirkung der enantiomeren Verbindungen (*R*)- und (*S*)-**50** gegenüber CypA wurde auch durch die in dieser theoretischen Studie berechneten Bindungsenergien bestätigt. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass der sterische Anspruch der Methylgruppe am stereogenen Zentrum ein ungünstiges Andocken für den (*S*)- im Vergleich zum (*R*)-Enantiomer im aktiven Zentrum bewirkt. Eine Darstellung ist in Abbildung 15 mit Überlagerungen von (*R*)- und (*S*)-**50** in CypA wiedergegeben.

Tabelle 1: Selektive Inhibierung von CypA gegenüber CypB durch die Ketone **50**, **52** und **53**.

Eintrag	Verbindung	K_i [μ M] CypA	K_i [μ M] CypB
1	52 	0.52 ± 0.15	> 100
2	53b 	0.3 ± 0.1	12 ± 5
3	53c 	1.7 ± 0.5	8.6 ± 0.9
4	(R)-50 	7.5 ± 1.5	40 ± 10
5	(S)-50 	> 100	> 100

Wie für Biarylindanylketone erwartet, erwies sich Verbindung **53b** als nicht-immunsuppressiver Inhibitor von CypA ohne Aktivität gegen CN. Ähnlich wie nicht-immunsuppressive CsA-Derivate ist sie in der Lage, die Proliferation menschlicher Nabelvenen-Endothelzellen (HUVECs), die einen wichtigen Schritt der Angiogenese darstellt, mit einem IC_{50} -Wert von $5.4 \mu\text{M}$ zu inhibieren. Die bekannte antiangiogenetische Eigenschaft von CsA wurde ursprünglich der Inhibierung von CN zugeschrieben; die Wirksamkeit von Cyclophilin-Inhibitoren ohne die Fähigkeit, CN zu inhibieren, legt jedoch nahe, dass die Inhibierung von Cyclophilinen ausreicht, um die Proliferation und Angiogenese von HUVEC-Zellen zu verhindern.^[57]

5.2. N,N'-Disubstituierte Harnstoffderivate

Als weiteres Strukturmotiv bildet N,N'-disubstituierter Harnstoff die Kerneinheit von Cyclophilin inhibierenden niedermolekularen Verbindungen, die aus dem De-novo-Wirkstoffdesign hervorgegangen sind. Die hier verwendeten, einfach aufgebauten Verbindungen sind entweder kommerziell erhältlich oder durch einfache konventionelle Umwandlungen zugänglich. Durch ein virtuelles Screening identifizierten und optimierten Guichou und Mitarbeiter Arylpyridylharnstoffe als "strukturbasiert entworfene", in vitro wirksame Inhibitoren der PPIase-Aktivität von CypA. Ausgehend von den Leitstrukturen **55a,b** ergaben sich die optimierten Verbindungen **56a,b** mit IC_{50} -Werten von 14 bzw. 20 nM. Die Verbindung **55a** inhibiert die HIV-1-Replikation (Abbildung 16).^[123]

Inspiziert von diesen Ergebnissen haben Li und Mitarbeiter einen computergestützten Wirkstoffdesignansatz für die Entwicklung verbesserter, auf dem Harnstoffgerüst basierender Inhibitoren genutzt. Die effizientesten Verbindungen dieses Konzepts sind die Benzoylharnstoffe **57a** und **57b** mit IC_{50} -Werten im einstelligen nanomolaren Bereich für die Inhibierung der PPIase-Aktivität von CypA. Ein Docking-Modell der Verbindung **57b** an das aktive Zentrum von CypA deutet auf eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Arg55 und dem Benzoyl-Sauerstoffatom der Verbindung hin.^[125, 126]

Inspiziert von diesen Ergebnissen haben Li und Mitarbeiter einen computergestützten Wirkstoffdesignansatz für die Entwicklung verbesserter, auf dem Harnstoffgerüst basierender Inhibitoren genutzt. Die effizientesten Verbindungen dieses Konzepts sind die Benzoylharnstoffe **57a** und **57b** mit IC_{50} -Werten im einstelligen nanomolaren Bereich für die Inhibierung der PPIase-Aktivität von CypA. Ein Docking-Modell der Verbindung **57b** an das aktive Zentrum von CypA deutet auf eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Arg55 und dem Benzoyl-Sauerstoffatom der Verbindung hin.^[125, 126]

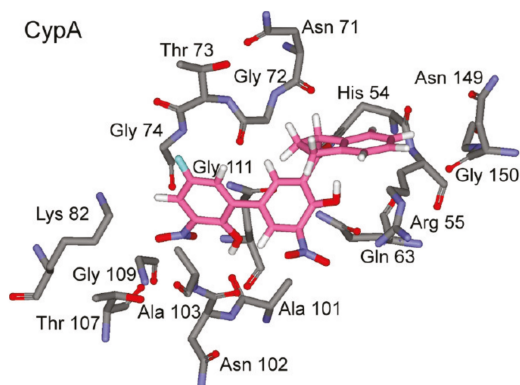
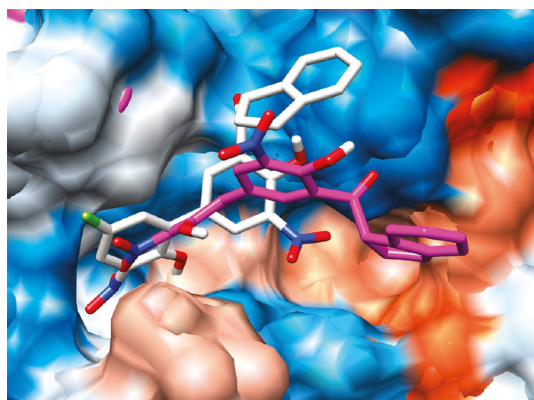


Abbildung 14. Überlagerte aktive Zentren von CypA (grau) und CypB (rosa) mit dem an die aktiven Zentren gebundenen Biarylindanylketon **52** (oben). Verbindung **52** gebunden an das aktive Zentrum von CypA mit grauen Resten. Benachbarte Wassermoleküle wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen (unten) (kopiert aus Lit. [122]).

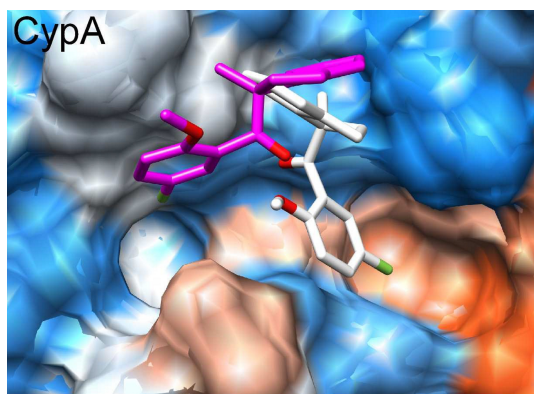


Abbildung 15. Überlagerung von (R)-**50** (grau) und (S)-**50** (rosa) an den aktiven Stellen von Cyp. Benachbarte Wassermoleküle wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen (kopiert aus Lit. [122]).

Bei der Suche nach Cyclophilin-Inhibitoren wurde auch das Konzept der fragmentbasierten Wirkstoff-Forschung angewendet. Zu diesem Zweck werden zahlreiche Fragmente rechnerisch an das aktive Zentrum des Targets angedockt. Aus diesen Ergebnissen wird eine kleine Anzahl von Fragmenten ausgewählt und in einem chemisch sinnvollen Konzept kombiniert. Schließlich werden die ausgewählten Ver-

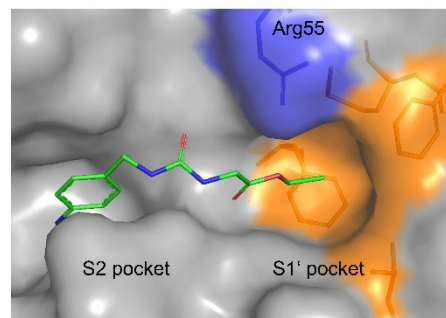
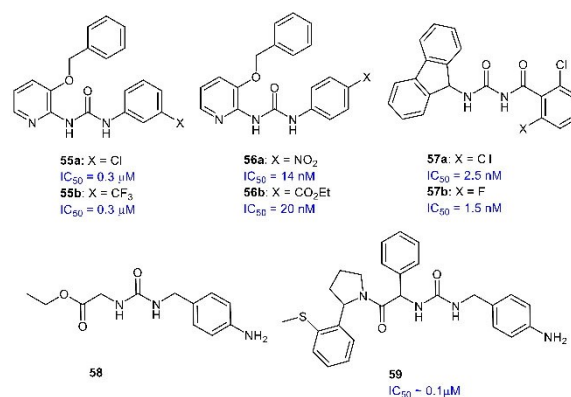


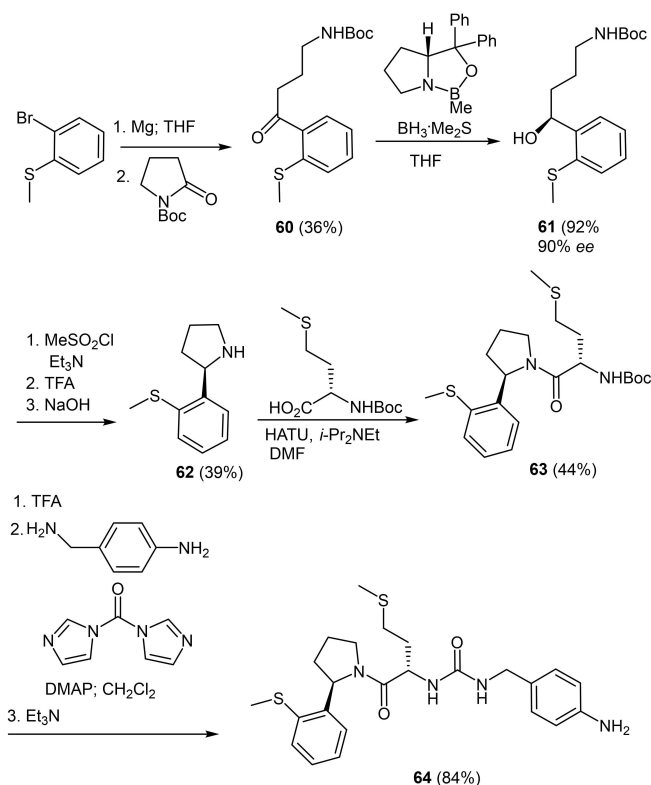
Abbildung 16. CypA-Inhibitoren mit einem Harnstoffgerüst. Pyridylaryl-harnstoffe **55** und **56** und Benzoylharnstoffe **57** mit IC_{50} -Werten der Inhibierung der CypA-PPLase-Aktivität (oben),^[126] Leitfragment **58** und optimierter CypA-, CypB- und CypD-Inhibitor **59** (Mitte); Kristallstruktur der Leitverbindung **58** im Komplex mit CypA (PDB ID: 3RDD).^[124] Die S1'-Tasche ist definiert als die Prolinbindungstasche, die von Phe60, Met61, Phe113 und Leu122 gebildet wird (orange dargestellt). Die S2-Tasche ist definiert als die Tasche für die Bindung des Aminosäurerestes P2 des Substrats (unten).

bindungen synthetisiert und auf ihre Aktivität hin untersucht. Diese Strategie wurde von Guichou und Mitarbeitern genutzt und führte zu Verbindungen, bei denen die ausgewählten Fragmente durch eine Harnstoffgruppe verbunden sind. Die Substituenten besetzen die S2- und die S1'-Tasche von CypA sowie CypD, wie anhand der Kristallstrukturen der Cyclophilin-Komplexe mit der Verbindung **58** gezeigt, die aus der ursprünglichen Kombination der Fragmente resultiert (Abbildung 16). Die Struktur des CypA-**58**-Komplexes zeigt, dass die Harnstoffgruppe eine Brücke über den Sattel zwischen den beiden Taschen bildet und die Esterfunktion eine Wasserstoffbrücke zum Argininrest Arg55 am aktiven Zentrum des Cyclophilins bildet. Während der Optimierung wurde eine Phenyl-Pyrrolidin-Gruppe zur Besetzung der S1'-Tasche eingeführt. Dies führt zu einer Verschiebung der Arginin-Wasserstoffbindung in Richtung der Harnstoff-Carbonylgruppe im Cyclophilin-Inhibitor-Komplex. Auf diese Weise wird die enthalpiebasierte Bindung beibehalten und mit einem weniger ungünstigen entropischen Term kombiniert.

Als optimales Ergebnis wurde der N,N'-disubstituierte Harnstoff **59** beschrieben (Abbildung 16). Die synthetisierte Verbindung, offensichtlich ein racemisches Gemisch aus zwei Diastereomeren, inhibiert CypA, B und D mit IC_{50} -

Werten von 0,1, 0,08 bzw. 0,2 μM und zeigt in vitro antivirale Aktivität gegen HCV, HIV, Coronaviren und Flaviviren. Der Komplex aus CypA und Verbindung **59** zeigte keine Inhibierung von CN.^[124,127]

Aufgrund der hohen Affinität von 2-Arylpyrrolidin-Analoga zu CypD, die von Guichous Gruppe nachgewiesen wurde,^[127b] analysierten O'Neil und Mitarbeiter N,N'-disubstituierte Harnstoffderivate und ihre stereochemischen Anforderungen als CypD-Inhibitoren. Die aktivste Verbindung, **64**, wurde stereoselektiv synthetisiert, wie in Schema 10 dargestellt.^[128] Das aus *o*-Bromthioanisol herge-



Schema 10. Stereoselektive Synthese des Harnstoffderivats **64**. HATU = O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat.

stellte Grignard-Reagenz wurde mit Boc-geschütztem Pyrrolidinon zum Keton **60** umgesetzt. Die Carbonylgruppe wurde dann mittels CBS-Katalyse enantioselectiv reduziert, um das Carbinol **61** in 90% *ee* zu erhalten. Anschließend führte die Bildung des Mesylats, die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe und die baseninduzierte Cyclisierung zu Pyrrolidin **62**. Die Verknüpfung mit Boc-geschütztem (*S*)-Methionin ergab das Dipeptid **63**. Die letzten Schritte bestanden aus N-Entschützung und Kopplung mit Carbonyldiimidazol und *p*-Aminobenzylamin und ergaben das Syntheseziel, das Harnstoffderivat **64**, das offensichtlich als einziges, enantiomerenreines Diastereomer isoliert wurde,^[129] jedoch als 2:1-Rotamerengemisch vorlag.

Die Bindungs- und Inhibierungskonstanten von Verbindung **64** gegenüber CypD wurden mit $K_d=0.41 \mu\text{M}$ und mit

$K_i=99 \text{ nM}$ bestimmt. Die gemessenen Bindungsenergien betragen $\Delta G=-8.71$, $\Delta H=-12.49$ und $T\Delta S=-3.78 \text{ kcal mol}^{-1}$. Der ungünstige Entropieterm, der zu einer Verringerung des ΔG - im Vergleich zum ΔH -Wert führt, wurde auf die konformationelle Flexibilität des Enzyms zurückgeführt. Die Kristallstruktur der an CypD gebundenen Verbindung **64** (Abbildung 17) zeigt eine Vielzahl nicht-

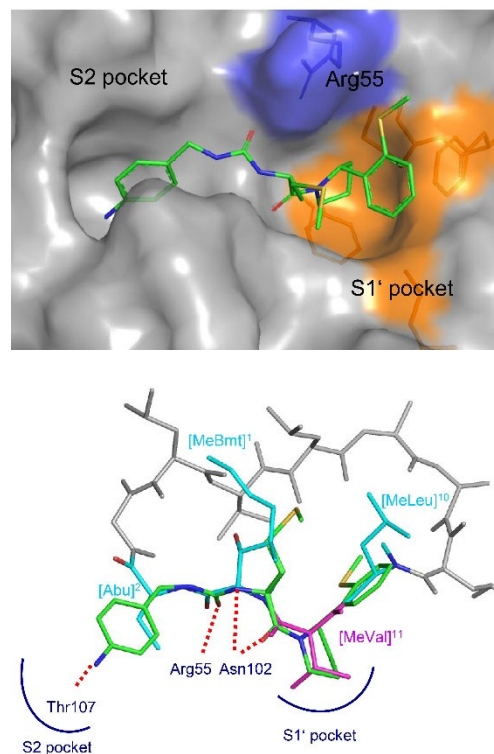


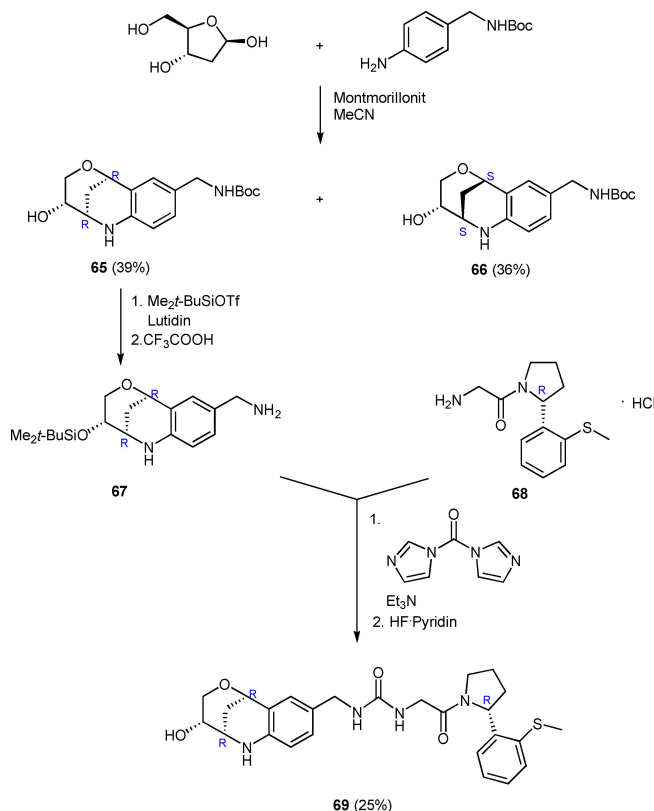
Abbildung 17. Kristallstruktur der Verbindung **64**, gebunden an CypD (PDB ID: 4J5C).^[124] Hervorgehoben ist die Oberfläche von Arg55 in Blau und Phe60, Met61, Phe113 und Leu122 in Orange mit einer an CypA angepassten Nummerierung. Nummerierung in CypD: Arg96, Phe101, Met102, Phe154, und Leu163 (oben). Überlagerung von Verbindung **64** (grün, PDB ID: 4J5C)^[124] und CsA (cyan/grau, PDB ID: 2Z6W),^[130] gebunden an CypD. Die Proteinstruktur wurde zugunsten der Übersichtlichkeit weggelassen. Die Wasserstoffbindungen der Verbindung **64** zu den Resten des aktiven Zentrums von CypD sind schematisch dargestellt. CsA [MeVal]¹¹¹ (rosa) befindet sich in der S1'-Tasche des Cyclophilins (unten).

kovalenter kooperativer Wechselwirkungen, einschließlich Wasserstoffbrückenbindungen zu Arg55, Thr107 und Asn102 (CypA-Nummerierung). Die (*S*)-Methionin-Seitenkette von **64** ist in der Nähe von Asn102, Ala103 und Gly104 in ähnlicher Weise wie der [MeBmt]¹-Rest von CsA positioniert, von dem bekannt ist, dass er in Van-der-Waals-Kontakt mit Ala103 steht.

Durch weitere Verwendung des fragmentbasierten Ansatzes bei der Suche nach CypD-Inhibitoren wurde ein bicyclisches Fragment gefunden, das in die S2-Tasche von CypD passte. Dieses Fragment wurde mit dem S1'-Bindungsanteil von Verbindung **59** kombiniert, was zum wirksamsten Harnstoffderivat **69** mit einem mittels Oberflächen-

plasmonenresonanz (SPR) bestimmten K_d -Wert von 6 nM und einem IC_{50} -Wert für die Inhibierung der PPIase-Aktivität von CypD von 4 nM führte.^[131] Die Verwendung einer Oxalyl- oder Amidgruppe anstelle des Harnstoff-Linkers zur Verbindung der Fragmente führt zu einer geringeren Affinität zu CypD. Dies gilt auch für andere Diastereomere von Verbindung **69** – eine Beobachtung, die die Bedeutung der “richtigen” Konfiguration der Oxazabicyclo[3.3.1]nonan-Gruppe für die Anpassung an die S2-Tasche unterstreichen mag.

Die in Schema 11 skizzierte Ex-Chiral-Pool-Synthese des N,N'-disubstituierten Harnstoffs **69** beginnt mit einer Mont-



Schema 11. Synthese der Verbindung **69**.

morillonit-vermittelten Kondensation zwischen 2-Desoxy-D-ribose und Boc-geschütztem 4-Aminobenzylamin. Die Reaktion führt zu einer nahezu 1:1-Mischung der beiden Diastereomere **65** und **66**. Nach chromatographischer Trennung wurde das Produkt **65** mit (*R,R*)-konfigurierten Brückenkopffzentren in 39% Ausbeute isoliert und durch Schutz der Hydroxy- und Abspaltung der Boc-Gruppen in das Zwischenprodukt **67** überführt. Anschließend wurde es mit (*R*)-Pyrrolidin **68** in Gegenwart von Carbonyldiimidazol kondensiert, um die Harnstoffbildung zu bewirken. Schließlich führte die Abspaltung der Silylschutzgruppe zum Produkt **69**, das als reines Diastereomer und Enantiomer erhalten wurde.

Interessanterweise wurde durch weitere, auf die S2-Bindungstasche hin zielende Alkylierung des Harnstoff-

Stickstoffs in den auf der Leitstruktur **58** basierenden Verbindungen eine zusätzliche Kontaktstelle zwischen dem Inhibitor und dem aktiven Zentrum des Cyclophilins geschaffen, was in einigen Fällen die Affinität verbesserte. Für einen optimierten alkylierten Aryl-Pyrrolidin-Harnstoff wurde mittels SPR ein K_d von 70 nM ermittelt.^[132]

Aufgrund der effizienten Inhibierung von CypD durch die N,N'-disubstituierten Harnstoffderivate ist der Einfluss dieser Inhibitoren auf den mitochondrialen Permeabilitätsübergang und die damit verbundenen Signalwege von großem Interesse. Es wurde festgestellt, dass Verbindung **59** die Öffnung der mPTP in Herz und Leber inhibiert und vor Ischämie-/Reperfusionsschäden in der Mausleber schützt.^[133] Auch der Schutz von murinen sowie humanen Azinuszellen der Bauchspeicheldrüse durch Verbindung **59** vor toxininduziertem Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials und Nekrose, die kritische Prozesse in der Pathogenese der akuten Pankreatitis darstellen, kann als Ergebnis der Inhibierung der CypD-vermittelten mPTP-Öffnung angesehen werden.^[127]

Im Rahmen der fragmentbasierten Wirkstoff-Forschung wurde auch eine Vielzahl einfacher, kommerziell erhältlicher, hauptsächlich heterocyclischer Verbindungen als bindende Agenzien für die verschiedenen Isoformen der Cyclophiline identifiziert. Typische Vertreter sind 3,4-Diaminobenzamid oder 2-Amino-3-methylpyridin. Die in dieser Studie verwendeten Untersuchungsmethoden waren Röntgenbeugung, SPR und Molekulardynamiksimulationen. Die Werte der freien Bindungsenergie wurden berechnet, die Bindungskonstanten wurden als millimolar geschätzt. Die biochemischen Wirkungen dieser einfachen Verbindungen wurden noch nicht mitgeteilt.^[134]

5.3. Sulfonamide

Eine dritte Struktureinheit, das klassische Sulfonamid-Pharmakophor, hat kürzlich eine Renaissance als *niedermolekularer* Cyclophilin-Inhibitor erlebt. Durch strukturbasiertes Design, Pharmakophor-Modellierung, virtuelles Screening und Docking-Studien wurde das Sulfonamid **70** als Inhibitor von CypD mit einem K_i -Wert von 1.3 μM ^[135] identifiziert (Abbildung 18).

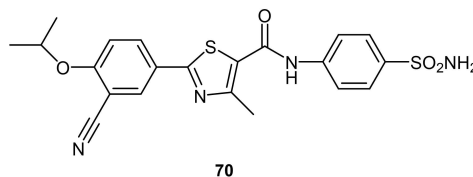


Abbildung 18. Struktur des Sulfonamids **70**.

Das mit Standardmethoden synthetisierte Sulfonamid **70** erwies sich als wirksam gegen A β -induzierte mitochondriale Dysfunktion und Zelltod und wurde als Kandidat für die Behandlung der Alzheimer-Krankheit empfohlen.^[135]

6. Schlussfolgerung

Die Suche nach Cyclophilin-Inhibitoren ohne immunsuppressive Wirkung ist als lohnende Aufgabe erkannt worden. Vielfältige Modifikationen von CsA und Sanglifhrin durch Partialsynthesen, aber auch Totalsynthese de novo erzeugter niedermolekularer Verbindungen lieferten eine große Vielfalt an nicht-immunsuppressiven Cyclophilin-Inhibitoren. Viele dieser Verbindungen haben sich in vivo und in vitro als antivirale Wirkstoffe bewährt, und mehrere wurden in klinischen Versuchen geprüft. Diese Tour d'Horizon möge zu weiteren Anstrengungen ermutigen, zugelassene Arzneimittel auf der Grundlage des Konzepts der Cyclophilin-Inhibierung durch nicht-immunsuppressive Verbindungen zu entwickeln.

Danksagung

Neben der Max-Planck-Gesellschaft möchten wir unseren enthusiastischen Mitarbeitern danken, die in den Literaturzitierten erwähnt sind; ihre Beiträge verdienen hohe Anerkennung. Unsere Forschung wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft über viele Jahre hinweg großzügig unterstützt.

Übersetzt von Dr. Katja Weimann-Antovic (M.Sc.Biochem.) und Dragutin Antovic (M.Sc.Biochem.). Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

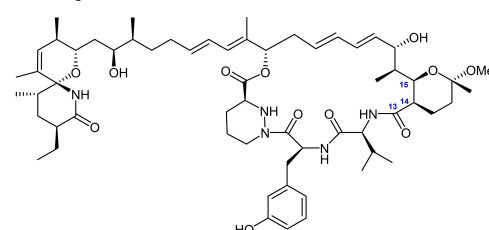
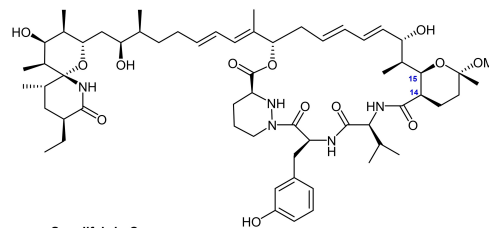
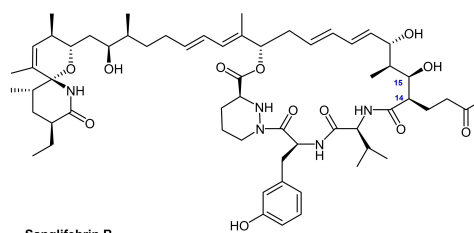
Stichwörter: Antivirale Wirkstoffe · Enzym · Medizinische Chemie · PPIase · Peptide

- [1] a) G. Fischer, H. Bang, C. Mech, *Biomed. Biochim. Acta* **1984**, *43*, 1101–1111; b) G. Fischer, B. Wittmann-Liebold, K. Lang, T. Kiefhaber, F. X. Schmid, *Nature* **1989**, *337*, 476–478; c) N. Takahashi, T. Hayano, M. Suzuki, *Nature* **1989**, *337*, 473–475.
- [2] a) G. Fischer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1415–1436; *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1479–1501; b) G. Fischer, *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 119–127; c) J. Fanghänel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 490–492; *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 506–508.
- [3] J. Fanghänel, G. Fischer, *Front. Biosci.* **2004**, *9*, 3453–3478.
- [4] a) A. Galat, J. Bua, *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 3467–3488; b) H. Hoffmann, C. Schiene-Fischer, *Biol. Chem.* **2014**, *395*, 721–735; c) C. Schiene-Fischer, T. Aumüller, G. Fischer, *Top. Curr. Chem.* **2013**, *328*, 35–67.
- [5] Review: P. Wang, J. Heitman, *Genome Biol.* **2005**, *6*, 226.
- [6] R. E. Handschumacher, M. W. Harding, J. Rice, R. J. Drugge, D. W. Speicher, *Science* **1984**, *226*, 544–547.
- [7] Zu kontroversen Einschätzungen der Entdeckung der immunsuppressiven Wirkung von Cyclosporin, siehe: a) J. F. Borel, Z. L. Kis, *Transplant. Proc.* **1991**, *23*, 1867–1874; b) H. F. Stähelin, *Experientia* **1996**, *52*, 5–13; c) K. Heusler, A. Pletscher, *Swiss Med. Wkly.* **2001**, *131*, 299–302.
- [8] C. Tapia, T. A. Nessel, P. M. Zito, *Cyclosporine*, StatPearls, Treasure Island, **2021**.
- [9] a) J. Liu, J. D. Farmer, Jr., W. S. Lane, J. Friedman, I. Weissman, S. L. Schreiber, *Cell* **1991**, *66*, 807–815; b) Q. Huai, H. Y. Kim, Y. Liu, Y. Zhao, A. Mondragon, J. O. Liu, H. Ke, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 12037–12042; c) L. Jin, S. C. Harrison, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 13522–13526.
- [10] a) B. M. Duniak, J. E. Gestwicki, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 9622–9644; b) P. T. Flaherty, P. Jain, *Annu. Rep. Med. Chem.* **2011**, *46*, 337–349.
- [11] Zu Übersichtsartikeln, die die Entwicklung dieses Gebietes bis zum Beginn der 2010er Jahre beschreiben, siehe: a) P. A. Gally, *Immunol. Res.* **2012**, *52*, 200–210; b) M. Peel, A. Scribner, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 4485–4492; c) N. V. Naoumov, *J. Hepatol.* **2014**, *61*, 1166–1174.
- [12] A. J. Koletsky, M. W. Harding, R. E. Handschumacher, *J. Immunol.* **1986**, *137*, 1054–1059.
- [13] C. Rajiv, T. L. Davis, *Biomol. Eng.* **2018**, *8*, 161.
- [14] a) J. L. Kofron, P. Kuzmic, V. Kishore, E. Colon-Bonilla, D. H. Rich, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6127–6134; b) B. Janowski, S. Wollner, M. Schutkowski, G. Fischer, *Anal. Biochem.* **1997**, *252*, 299–307; c) G. Zoldák, T. Aumüller, C. Lücke, J. Hritz, C. Oostenbrink, G. Fischer, F. X. Schmid, *Biochemistry* **2009**, *48*, 10423–10436.
- [15] R. K. Harrison, R. L. Stein, *Biochemistry* **1990**, *29*, 3813–3816.
- [16] a) N. Baum, C. Schiene-Fischer, M. Frost, M. Schumann, K. Sabapathy, O. Ohlenschläger, F. Grosse, B. Schlott, *Oncogene* **2009**, *28*, 3915–3925; b) K. Bauer, A. K. Kretschmar, H. Cvijic, C. Blumert, D. Löffler, K. Brocke-Heidrich, C. Schiene-Fischer, G. Fischer, A. Sinz, C. V. Clevenger, F. Horn, *Oncogene* **2009**, *28*, 2784–2795; c) H. Pan, C. Luo, R. Li, A. Qiao, L. Zhang, M. Mines, A. M. Nyanda, J. Zhang, G.-H. Fan, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 623–637; d) C. Zhu, X. Wang, J. Deinum, Z. Huang, J. Gao, N. Modjtahedi, M. R. Neagu, M. Nilsson, P. S. Eriksson, H. Hagberg, J. Luban, G. Kroemer, K. Blomgren, *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 1741–1748; e) J. Colgan, M. Asmal, M. Neagu, B. Yu, J. Schneidkraut, Y. Lee, E. Sokolskaja, A. Andreotti, J. Luban, *Immunity* **2004**, *21*, 189–201; f) P. Sarkar, T. Saleh, S.-R. Tzeng, R. B. Birge, C. G. Kalodimos, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 51–57; g) J. C. Marini, W. A. Cabral, A. M. Barnes, W. Chang, *Cell Cycle* **2007**, *6*, 1675–1681; h) M. A. Ryczyn, C. V. Clevenger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 6790–6795; i) A. P. Halestrap, *Biochem. Soc. Symp.* **1999**, *66*, 181–203; j) C. P. Baines, M. Gutiérrez-Aguilar, *Cell Calcium* **2018**, *73*, 121–130; k) T. Ratajczak, B. K. Ward, R. F. Minchin, *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 1348–1357.
- [17] a) B. Sherry, N. Yarlett, A. Strupp, A. Cerami, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 3511–3515; b) E. R. Price, M. Jin, D. Lim, S. Pati, C. T. Walsh, F. D. McKeon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 3931–3935; c) V. Yurchenko, G. Zybarth, M. O'Connor, W. W. Dai, G. Franchin, T. Hao, H. Guo, H.-C. Hung, B. Toole, P. Gallay, B. Sherry, M. Bukrinsky, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 22959–22965.
- [18] a) M. Lammers, H. Neumann, J. W. Chin, L. C. James, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 331–337; b) N. N. Soe, M. Sowden, P. Baskaran, Y. Kim, P. Nigro, E. M. Smolock, B. C. Berk, *Cardiovasc. Res.* **2014**, *101*, 444–453; c) M. Schumann, C. H. Ihling, E. Prell, A. Schierhorn, A. Sinz, G. Fischer, C. Schiene-Fischer, M. Malešević, *Proteomics* **2016**, *16*, 2815–2826.
- [19] a) S. D. Frausto, E. Lee, H. Tang, *Viruses* **2013**, *5*, 1684–1701; b) P. Nigro, G. Pompilio, M. C. Capogrossi, *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e888; c) J. Lee, S. S. Kim, *J. Int. Med. Res.* **2010**, *38*,

- 1561–1574; d) C. Xue, M. P. Sowden, B. C. Berk, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2018**, *38*, 986–993; e) M. Bukrinsky, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2015**, *1850*, 2087–2095; f) J. Luban, K. L. Bossolt, E. K. Franke, G. V. Kalpana, S. P. Goff, *Cell* **1993**, *73*, 1067–1078; g) K. Wataashi, N. Ishii, M. Hijikata, D. Inoue, T. Murata, Y. Miyani, K. Shimotohno, *Mol. Cell* **2005**, *19*, 111–122; h) F. S. van Dijk, I. M. Nesbitt, E. H. Zwijkstra, P. G. Nikkels, S. R. Piersma, S. A. Fratantoni, C. R. Jimenez, M. Huizer, A. C. Morsman, J. M. Cobben, M. H. van Roij, M. W. Elting, J. I. Verbeke, L. C. Wijnaendts, N. J. Shaw, W. Hogler, C. McKeown, E. A. Sistermans, A. Dalton, H. Meijers-Heijboer, G. Pals, *Am. J. Hum. Genet.* **2009**, *85*, 521–527; i) G. Amanakis, E. Murphy, *Front. Plant Physiol.* **2020**, *11*, 595.
- [20] a) X. Liu, Z. Zhao, W. Liu, *Viruses* **2013**, *5*, 182–191; b) M. Qing, F. Yang, B. Zhang, G. Zou, J. M. Robida, Z. Yuan, H. Tang, P. Y. Shi, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 3226–3235; c) A. H. de Wilde, U. Pham, C. C. Posthuma, E. J. Snijder, *Virology* **2018**, *522*, 46–55.
- [21] a) T. R. Gamble, F. F. Vajdos, S. Yoo, D. K. Worthylake, M. Houseweart, W. I. Sundquist, C. P. Hill, *Cell* **1996**, *87*, 1285–1294; b) A. De Iaco, J. Luban, *Retrovirology* **2014**, *11*, 11.
- [22] a) F. Fernandes, I. U. Ansari, R. Striker, *PLoS One* **2010**, *5*, e9815; b) X. Hanouille, A. Badillo, J. M. Wieruszkeski, D. Verdegem, I. Landrieu, R. Bartenschlager, F. Penin, G. Lippens, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 13589–13601; c) D. Verdegem, A. Badillo, J. M. Wieruszkeski, I. Landrieu, A. Leroy, R. Bartenschlager, F. Penin, G. Lippens, X. Hanouille, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 20441–20454; d) U. Chatterji, M. Bobardt, A. Tai, M. Wood, P. A. Gallay, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 2496–2507.
- [23] a) Y. Ma-Lauer, Y. Zheng, M. Malesevic, B. von Brunn, G. Fischer, A. von Brunn, *Antiviral Res.* **2020**, *173*, 104620; b) J. Carbajo-Lozoya, Y. Ma-Lauer, M. Malesevic, M. Theuerkorn, V. Kahlert, E. Prell, B. von Brunn, D. Muth, T. F. Baumert, C. Drosten, G. Fischer, A. von Brunn, *Virus Res.* **2014**, *184*, 44–53; c) A. H. de Wilde, V. S. Raj, D. Oudshoorn, T. M. Bestebroer, S. van Nieuwkoop, R. Limpens, C. C. Posthuma, Y. van der Meer, M. Barcena, B. L. Haagmans, E. J. Snijder, B. G. van den Hoogen, *J. Gen. Virol.* **2013**, *94*, 1749–1760; d) A. H. de Wilde, D. Falzarano, J. C. Zevenhoven-Dobbe, C. Beugeling, C. Fett, C. Martellaro, C. C. Posthuma, H. Feldmann, S. Perlman, E. J. Snijder, *Virus Res.* **2017**, *228*, 7–13.
- [24] A. H. de Wilde, J. C. Zevenhoven-Dobbe, Y. van der Meer, V. Thiel, K. Narayanan, S. Makino, E. J. Snijder, M. J. van Hemert, *J. Gen. Virol.* **2011**, *92*, 2542–2548.
- [25] a) A. Pizzorno, B. Padey, J. Dubois, T. Julien, A. Traversier, V. Duliere, P. Brun, B. Lina, M. Rosa-Calatrava, O. Terrier, *Antiviral Res.* **2020**, *181*, 104878; b) M. Dittmar, J. S. Lee, K. Whig, E. Segrist, M. Li, B. Kamalia, L. Castellana, K. Ayyanathan, F. L. Cardenas-Diaz, E. E. Morrisey, R. Truitt, W. Yang, K. Jurado, K. Samby, H. Ramage, D. C. Schultz, S. Cherry, *Cell Rep.* **2021**, *35*, 108959; c) J. S. Redzic, E. Lee, A. Born, A. Issaian, M. A. Henen, P. J. Nichols, A. Blue, K. C. Hansen, A. D'Alessandro, B. Vogeli, E. Z. Eisenmesser, *J. Mol. Biol.* **2021**, *433*, 167108.
- [26] J. L. Gálvez-Romero, O. Palmeros-Rojas, F. A. Real-Ramírez, S. Sánchez-Romero, R. Tome-Maxil, M. P. Ramírez-Sandoval, R. Olivros-Rodríguez, S. E. Flores-Encarnación, A. A. Cabrera-Estrada, J. Ávila-Morales, V. Cortés-Sánchez, G. Sarmiento-Padilla, S. E. Tezmoz-Ramírez, D. Aparicio-Hernández, M. I. Urbina-Sánchez, M. A. Gómez-Pluma, S. Cisneros-Méndez, D. I. Rodríguez-Rivas, S. Reyes-Inurrigarro, G. Cortés-Díaz, C. Cruz-Delgado, J. Navarro-González, J. Deveaux-Homs, S. Pedraza-Sánchez, *J. Intern. Med.* **2021**, *289*, 906–920.
- [27] a) A. Billich, G. Winkler, H. Aschauer, A. Rot, P. Peichl, *J. Exp. Med.* **1997**, *185*, 975–980; b) I. Tegeder, A. Schumacher, S. John, H. Geiger, G. Geisslinger, H. Bang, K. Brune, *J. Clin. Immunol.* **1997**, *17*, 380–386; c) E. J. Stemmy, A. S. Benton, J. Lerner, S. Alcalá, S. L. Constant, R. J. Freishtat, *J. Asthma* **2011**, *48*, 986–993.
- [28] a) P. Nigro, K. Satoh, M. R. O'Dell, N. N. Soe, Z. Cui, A. Mohan, J. Abe, J. D. Alexis, J. D. Sparks, B. C. Berk, *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 53–66; b) P. Seizer, C. Ochmann, T. Schonberger, S. Zach, M. Rose, O. Borst, K. Klingel, R. Kandolf, H. R. MacDonald, R. A. Nowak, S. Engelhardt, F. Lang, M. Gawaz, A. E. May, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2011**, *31*, 1377–1386; c) S. N. I. von Ungern-Sternberg, S. Vogel, B. Walker-Allgaier, S. Geue, A. Maurer, A. M. Wild, P. Munzer, M. Chatterjee, D. Heinzmann, E. Kremmer, O. Borst, P. Loughran, A. Zerneck, M. D. Neal, T. R. Billiar, M. Gawaz, P. Seizer, *Thromb. Haemostasis* **2017**, *117*, 2063–2078.
- [29] a) A. P. Halestrap, P. M. Kerr, S. Javadov, K. Y. Woodfield, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1998**, *1366*, 79–94; b) A. C. Schinzel, O. Takeuchi, Z. H. Huang, J. K. Fisher, Z. P. Zhou, J. Rubens, C. Hetz, N. N. Danial, M. A. Moskowitz, S. J. Korsmeyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 12005–12010; c) J. S. Park, R. Pasupulati, T. Feldkamp, N. F. Roeser, J. M. Weinberg, *Am. J. Physiol-Renal.* **2011**, *301*, F134–F150; d) J. Warne, G. Pryce, J. M. Hill, X. Shi, F. Lenneras, F. Puentes, M. Kip, L. Hilditch, P. Walker, M. I. Simone, A. W. Chan, G. J. Towers, A. R. Coker, M. R. Duchon, G. Szabadkai, D. Baker, D. L. Selwood, *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 4356–4373; e) E. Palma, T. Tiepolo, A. Angelin, P. Sabatelli, N. M. Maraldi, E. Basso, M. A. Forte, P. Bernardi, P. Bonaldo, *Hum. Mol. Genet.* **2009**, *18*, 2024–2031; f) X. Wang, H. Du, S. Shao, T. Bo, C. Yu, W. Chen, L. Zhao, Q. Li, L. Wang, X. Liu, X. Su, M. Sun, Y. Song, L. Gao, J. Zhao, *Hepatology* **2018**, *68*, 62–77.
- [30] H. Du, L. Guo, F. Fang, D. Chen, A. A. Sosunov, G. M. McKhann, Y. Yan, C. Wang, H. Zhang, J. D. Molkentin, F. J. Gunn-Moore, J. P. Vonsattel, O. Arancio, J. X. Chen, S. D. Yan, *Nat. Med.* **2008**, *14*, 1097–1105.
- [31] a) Z. Gong, C. Chi, X. Huang, H. Chu, J. Wang, F. Du, L. Jiang, J. Chen, *Anticancer Res.* **2017**, *37*, 4443–4447; b) E. S. Grigoryeva, N. V. Cherdynseva, M. S. Karbyshev, V. V. Volkomorov, I. V. Stepanov, M. V. Zavyalova, V. M. Perelmutter, M. A. Buldakov, S. G. Afanasjev, S. A. Tuzikov, Y. A. Bukurova, N. A. Lisitsyn, S. F. Beresten, *Pathol. Oncol. Res.* **2014**, *20*, 467–473; c) J. Yang, M. Zhou, R. Zhao, S. Peng, Z. Luo, X. Li, L. Cao, K. Tang, J. Ma, W. Xiong, S. Fan, D. C. Schmitt, M. Tan, X. Li, G. Li, *J. Proteomics* **2014**, *109*, 162–175; d) Y. Li, H. Guo, D. Dong, H. Wu, E. Li, *Diagn. Pathol.* **2013**, *8*, 207; e) M. Li, Q. Zhai, U. Bharadwaj, H. Wang, F. Li, W. E. Fisher, C. Chen, Q. Yao, *Cancer* **2006**, *106*, 2284–2294.
- [32] Z. Li, X. Zhao, S. Bai, Z. Wang, L. Chen, Y. Wei, C. Huang, *Mol. Cell. Proteomics* **2008**, *7*, 1810–1823.
- [33] a) R. Amundsen, H. Christensen, B. Zabihyan, A. Asberg, *Drug Metab. Dispos.* **2010**, *38*, 1499–1504; b) Y. Shitara, Y. Nagamatsu, S. Wada, Y. Sugiyama, T. Horie, *Drug Metab. Dispos.* **2009**, *37*, 1172–1178; c) A. A. K. El-Sheikh, R. Greupink, H. M. Wortelboer, J. J. van den Heuvel, M. Schreurs, J. B. Koenderink, R. Masereeuw, F. G. Russel, *Transl. Res.* **2013**, *162*, 398–409; d) P. R. Twentyman, *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *43*, 109–117.
- [34] H. Ke, D. Mayrose, P. J. Belshaw, D. G. Alberg, S. L. Schreiber, Z. Y. Chang, F. A. Etzkorn, S. Ho, C. T. Walsh, *Structure* **1994**, *2*, 33–44.
- [35] Y. Zhao, H. Ke, *Biochemistry* **1996**, *35*, 7356–7361.
- [36] V. Mikol, J. Kallen, G. Pflügl, M. D. Walkinshaw, *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 1119–1130.

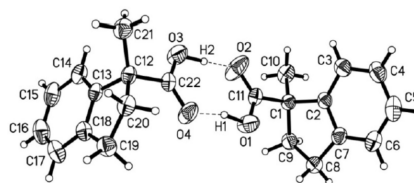
- [37] a) R. M. Wenger, J. France, G. Bovermann, L. Walliser, A. Widmer, H. Widmer, *FEBS Lett.* **1994**, *340*, 255–259; b) S. K. J. Johnas, B. Dittrich, A. Meents, M. Messerschmidt, E. F. Weckert, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2009**, *65*, 284–293. Hierauf beruhen die Zeichnungen von CsA innerhalb dieses Übersichtsartikels.
- [38] M. J. Bossard, P. L. Koser, M. Brandt, D. J. Bergsma, M. A. Levy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *176*, 1142–1148.
- [39] S. Y. Ko, R. M. Wenger, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 695–705.
- [40] D. Seebach, A. K. Beck, H. G. Bossler, C. Gerber, S. Y. Ko, C. W. Murtiashaw, R. Naef, S. Shoda, A. Thaler, M. Krieger, R. Wenger, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 1564–1590.
- [41] D. Seebach, A. K. Beck, A. Studer in *Modern Synthetic Methods, Vol. 7* (Hrsg.: B. Ernst, C. Leumann), Verlag Helvetica Chimica Acta, Basel/VCH, **1995**, S. 1–178.
- [42] V. F. J. Quesniaux, M. H. Schreier, R. M. Wenger, P. C. Hiestand, M. W. Harding, M. H. V. Van Regenmortel, *Eur. J. Immunol.* **1987**, *17*, 1359–1365.
- [43] Z. Su, Z. Long, Z. Huang, S. Yang, US 9,890,198 B2, **2018**.
- [44] S. Malouitre, H. Dube, D. Selwood, M. Crompton, *Biochem. J.* **2010**, *425*, 137–148.
- [45] C. Papageorgiou, X. Borer, R. R. French, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 267–272.
- [46] R. Traber, H. Kobel, H. R. Loosli, H. Senn, B. Rosenwirth, A. Lawen, *Antiviral Chem. Chemother.* **1994**, *5*, 331–339.
- [47] G. Zenke, G. Baumann, R. Wenger, P. Hiestand, V. Quesniaux, E. Andersen, M. H. Schreier, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1993**, *685*, 330–335.
- [48] F. Hubler, T. Ruckle, L. Patiny, T. Muamba, J. F. Guichou, M. Mutter, R. Wenger, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7193–7196.
- [49] M. Kuhnt, F. Bitsch, J. France, H. Hofmann, J. J. Sanglier, R. Traber, *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 781–787.
- [50] a) A. Billich, F. Hammerschmid, P. Peichl, R. Wenger, G. Zenke, V. Quesniaux, B. Rosenwirth, *J. Virol.* **1995**, *69*, 2451–2461; b) R. G. Ptak, P. A. Gally, D. Jochmans, A. P. Halestrap, U. T. Ruegg, L. A. Pallansch, M. D. Bobardt, M. P. de Béthune, J. Neyts, E. De Clercq, J. M. Dumont, P. Scalfaro, K. Besseghir, R. M. Wenger, B. Rosenwirth, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 1302–1317.
- [51] S. Ma, J. E. Boerner, C. TiongYip, B. Weidmann, N. S. Ryder, M. P. Cooreman, K. Lin, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 2976–2982.
- [52] a) E. J. Stemmy, M. A. Balsley, R. A. Jurjus, J. M. Damsker, M. I. Bukrinsky, S. L. Constant, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2011**, *45*, 991–998; b) P. Seizer, S. N. Ungern-Sternberg, T. Schönberger, O. Borst, P. Münzer, E. M. Schmidt, A. F. Mack, D. Heinzmann, M. Chatterjee, H. Langer, M. Malešević, F. Lang, M. Gawaz, G. Fischer, A. E. May, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2015**, *35*, 655–663.
- [53] K. Niimi, T. Yasui, A. Okada, Y. Hirose, Y. Kubota, Y. Umemoto, N. Kawai, K. Tozawa, K. Kohri, *Int. J. Urol.* **2014**, *21*, 707–713.
- [54] A. S. Korde, P. Waldmeier, L. C. Pettigrew, S. D. Craddock, W. F. Maragos, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2005**, *25*, S5–S5.
- [55] A. Zulian, E. Rizzo, M. Schiavone, E. Palma, F. Tagliavini, B. Blaauw, L. Merlini, N. M. Maraldi, P. Sabatelli, P. Braghetta, P. Bonaldo, F. Argenton, P. Bernardi, *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, 5353–5363.
- [56] a) A. Nicolli, E. Basso, V. Petronilli, R. M. Wenger, P. Bernardi, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 2185–2192; b) H. Fliri, G. Baumann, A. Enz, J. Kallen, M. Luyten, V. Mikol, R. Movva, V. Quesniaux, M. Schreier, M. Walkinshaw, R. Wenger, G. Zenke, M. Zurini, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1993**, *696*, 47–53.
- [57] B. A. Nacev, W. K. Low, Z. N. Huang, T. T. Su, Z. Su, H. Alkuraya, D. Kasuga, W. Sun, M. Träger, M. Braun, G. Fischer, K. Zhang, J. O. Liu, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, *338*, 466–475.
- [58] a) P. Scalfaro, J.-M. Dumont, G. Vuagniaux, R.-Y. Mauverny, WO 2006/038088, **2006**; b) zur Kristallstruktur von Alisporivir im Komplex mit CsA, siehe: M. Dujardin, J. Bouckaert, P. Rucktooa, X. Hanouille, *Acta Crystallogr. Sect. F* **2018**, *74*, 583–592.
- [59] S. Y. Ko, H. Kobel, B. Rosenwirth, D. Seebach, R. P. Traber, R. Wenger, P. Bollinger, EP 484281A2, **1992**.
- [60] M. Evers, J. C. Barrière, G. Bashiardes, A. Bousseau, J. C. Carry, N. Dereu, B. Filoche, Y. Henin, S. Sable, M. Vuilhorgne, S. Mignani, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 4415–4419.
- [61] a) P. A. Gally, U. Chatterji, M. D. Bobardt, Z. Long, S. Zhang, Z. Su, *PLoS One* **2016**, *11*, e0152036; b) Z. Su, S. Yang, Z. Long, WO 2017/200984A1, **2017**.
- [62] S. Hopkins, B. Scorneaux, Z. Huang, M. G. Murray, S. Wring, C. Smitley, R. Harris, F. Erdmann, G. Fischer, Y. Ribeill, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 660–672.
- [63] R. Flisiak, A. Horban, P. Gally, M. Bobardt, S. Selvarajah, A. Wiercinska-Drapalo, E. Siwak, I. Cielniak, J. Higersberger, J. Kierkus, C. Aeschlimann, P. Groscurin, V. Nicolas-Métral, J. M. Dumont, H. Porchet, R. Crabbé, P. Scalfaro, *Hepatology* **2008**, *47*, 817–826.
- [64] a) R. Flisiak, S. V. Feinman, M. Jablkowski, A. Horban, W. Kryczka, M. Pawlowska, J. E. Heathcote, G. Mazzella, C. Vandelli, V. Nicolas-Métral, P. Groscurin, J. S. Liz, P. Scalfaro, H. Porchet, R. Crabbé, *Hepatology* **2009**, *49*, 1460–1468; b) S. Hopkins, B. DiMassimo, P. Rusnak, D. Heuman, J. Lalezari, A. Sluder, B. Scorneaux, S. Mosier, P. Kowalczyk, Y. Ribeill, J. Baugh, P. Gally, *J. Hepatol.* **2012**, *57*, 47–54.
- [65] a) L. Coelmont, X. Hanouille, U. Chatterji, C. Berger, J. Snoeck, M. Bobardt, P. Lim, I. Vliegen, J. Paeshuyse, G. Vuagniaux, A. M. Vandamme, R. Bartenschlager, P. Gally, G. Lippens, J. Neyts, *PLoS One* **2010**, *5*, e13687; b) S. Hopkins, M. Bobardt, U. Chatterji, J. A. Garcia-Rivera, P. Lim, P. A. Gally, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 3888–3897.
- [66] A. I. Chiramel, L. Banadyga, J. D. Dougherty, D. Falzarano, C. Martellaro, D. Brees, R. T. Taylor, H. Ebihara, S. M. Best, *J. Infect. Dis.* **2016**, *214*, S355–S359.
- [67] L. Sauerhering, A. Kupke, L. Meier, E. Dietzel, J. Hoppe, A. D. Gruber, S. Gattenloehner, B. Witte, L. Fink, N. Hofmann, T. Zimmermann, A. Goesmann, A. Nist, T. Stiewe, S. Becker, S. Herold, C. Peteranderl, *Eur. Respir. J.* **2020**, *56*, 1901826.
- [68] L. Softic, R. Brillet, F. Berry, N. Ahnou, Q. Nevers, M. Morin-Dewaele, S. Hamadat, P. Bruscella, S. Fourati, J. M. Pawlotsky, A. Ahmed-Belkacem, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, e00876.
- [69] a) M. Schiavone, A. Zulian, S. Menazza, V. Petronilli, F. Argenton, L. Merlini, P. Sabatelli, P. Bernardi, *Pharmacol. Res.* **2017**, *125*, 122–131; b) A. LoGuidice, V. Ramirez-Alcantara, A. Proli, B. Gavillet, U. A. Boelsterli, *Toxicol. Sci.* **2010**, *118*, 276–285; c) L. Gomez, H. Thibault, A. Gharib, J. M. Dumont, G. Vuagniaux, P. Scalfaro, G. Derumeaux, M. Ovize, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2007**, *293*, H1654–1661.
- [70] J. Lin, F. Shen, J. Lu, F. Liang, Y. Zhang, Z. Xie, Y. Dong, *Front. Aging Neurosci.* **2021**, *13*, 688587.
- [71] a) F. Loor, F. Tiberghien, T. Wenandy, A. Didier, R. Traber, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4598–4612; b) T. Kamisako, I. Leier, Y. Cui, J. König, U. Buchholz, J. Hummel-Eisenbeiss, D. Keppler, *Hepatology* **1999**, *30*, 485–490.
- [72] J. Fu, M. Tjandra, C. Becker, D. Bednarczyk, M. Capparelli, R. Elling, I. Hanna, R. Fujimoto, M. Furegati, S. Karur, T. Kasprzyk, M. Knapp, K. Leung, X. Li, P. Lu, W. Mergo, C. Miault, S. Ng, D. Parker, Y. Peng, S. Roggo, A. Rivkin, R. L. Simmons, M. Wang, B. Wiedmann, A. H. Weiss, L. Xiao, L.

- Xie, W. Xu, A. Yifru, S. Yang, B. Zhou, Z. K. Sweeney, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 8503–8516.
- [73] T. Lazarova, Z. Weng, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2003**, *13*, 1327–1332.
- [74] a) D. H. Rich, C. Q. Sun, D. Guillaume, B. Dunlap, D. A. Evans, A. E. Weber, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1982–1987; b) J. D. Aebi, D. T. Deyo, C. Q. Sun, D. Guillaume, B. Dunlap, D. H. Rich, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 999–1009; c) N. H. Sigal, F. Dumont, P. Durette, J. J. Siekierka, L. Peterson, D. H. Rich, B. E. Dunlap, M. J. Staruch, M. R. Melino, S. L. Koprak, D. Williams, B. Witzel, J. M. Pisano, *J. Exp. Med.* **1991**, *173*, 619–628.
- [75] E. Prell, V. Kahlert, K. P. Rücknagel, M. Malešević, G. Fischer, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 63–65.
- [76] A. Hegmans, B. W. Fenske, D. J. Trepanier, M. D. Abel, S. Sugiyama, D. R. Ure, WO 2012079172A1, **2012**.
- [77] F. X. Li, Q. Z. Zhang, S. J. Li, G. Lin, X. Y. Huo, Y. Lan, Z. Yang, *Org. Lett.* **2021**, *23*, 3421–3425.
- [78] a) P. A. Gallay, M. D. Bobardt, U. Chatterji, D. J. Trepanier, D. Ure, C. Ordonez, R. Foster, *PLoS One* **2015**, *10*, e0134707; b) J. Kuo, M. Bobardt, U. Chatterji, P. R. Mayo, D. J. Trepanier, R. T. Foster, P. Gallay, D. R. Ure, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2019**, *371*, 231–241.
- [79] P. Gallay, D. Ure, M. Bobardt, U. Chatterji, J. Ou, D. Trepanier, R. Foster, *PLoS One* **2019**, *14*, e0217433.
- [80] C. Papageorgiou, J. Kallen, J. France, R. French, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 187–192.
- [81] a) J. Liu, M. W. Albers, T. J. Wandless, S. Luan, D. G. Alberg, P. J. Belshaw, P. Cohen, C. MacKintosh, C. B. Klee, S. L. Schreiber, *Biochemistry* **1992**, *31*, 3896–3901; b) J. P. Steiner, M. A. Connolly, H. L. Valentine, G. S. Hamilton, T. M. Dawson, L. Hester, S. H. Snyder, *Nat. Med.* **1997**, *3*, 421–428.
- [82] A. Scribner, D. Houck, Z. Huang, S. Mosier, M. Peel, B. Scorneaux, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6542–6546.
- [83] M. Malešević, J. Kühling, F. Erdmann, M. A. Balsley, M. I. Bukrinsky, S. L. Constant, G. Fischer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 213–215; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 219–222.
- [84] M. Malešević, D. Gutknecht, E. Prell, C. Klein, M. Schumann, R. A. Nowak, J. C. Simon, C. Schiene-Fischer, A. Saalbach, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7302–7311.
- [85] a) D. Heinzmann, A. Bangert, A. M. Müller, S. N. von Ungern-Sternberg, F. Emschermann, T. Schönberger, M. Chatterjee, A. F. Mack, K. Klingel, R. Kandolf, M. Malešević, O. Borst, M. Gawaz, H. F. Langer, H. Katus, G. Fischer, A. E. May, Z. Kaya, P. Seizer, *PLoS One* **2015**, *10*, e0124606; b) C. Xue, M. Sowden, B. C. Berk, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2017**, *37*, 1138–1146.
- [86] S. B. Park, G. P. Meier, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4215–4218.
- [87] H. Dube, D. Selwood, S. Malouitre, M. Capano, M. I. Simone, M. Crompton, *Biochem. J.* **2012**, *441*, 901–907.
- [88] S. Ho, N. Clipstone, L. Timmermann, J. Northrop, I. Graef, D. Fiorentino, J. Nourse, G. R. Crabtree, *Clin. Immunol. Immunopathol.* **1996**, *80*, 40–45.
- [89] S. Hyun, N. Park, S. H. Nam, D. H. Cheon, Y. Lee, H. S. Lim, J. Yu, *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 2388–2391.
- [90] a) J.-J. Sanglier, V. Quesniaux, T. Fehr, H. Hofmann, M. Mahnke, K. Memmert, W. Schuler, G. Zenke, L. Gschwind, C. Maurer, W. Schilling, *J. Antibiot.* **1999**, *52*, 466–473; b) T. Fehr, J. Kallen, L. Oberer, J.-J. Sanglier, W. Schilling, *J. Antibiot.* **1999**, *52*, 474–479. Die Strukturen der Sanglifehrine B–D unterscheiden sich von der des Sanglifehrins A in der spirocyclischen Einheit und/oder einer Acetalbildung in den Seitenketten an den C-14 und C-15:



- [91] a) K. C. Nicolaou, F. Murphy, S. Barluenga, T. Ohshima, H. Wei, J. Xu, D. L. F. Gray, O. Baudoin, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3830–3838; b) L. A. Paquette, M. Duan, I. Koneczki, C. Kempmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4257–4270; c) C.-F. Chang, H. A. Flaxman, C. M. Woo, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 17045–17052; *Angew. Chem.* **2021**, *133*, 17182–17189.
- [92] T. Lindel in *Organic Synthesis Highlights V* (Hrsg.: H.-G. Schmalz, T. Wirth), Wiley-VCH, Weinheim, **2003**, S. 350–359.
- [93] a) L. M. Martin Cabrejas, S. Rohrbach, D. Wagner, J. Kallen, G. Zenke, J. Wagner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2443–2446; *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2595–2599; b) R. Banteli, I. Brun, P. Hall, R. Metternich, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2109–2112; c) P. Hall, J. Brun, D. Denni, R. Metternich, *Synlett* **2000**, 315–318; d) J. Wagner, L. M. M. Cabrejas, C. E. Grossmith, C. Papageorgiou, F. Senia, D. Wagner, J. France, S. P. Nolan, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 9255–9260; e) R. Banteli, J. Wagner, G. Zenke, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1609–1612; f) M. K. Gurjar, A. R. Chaudhuri, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2435–2438; g) J. Wagner, H. Andres, S. Rohrbach, D. Wagner, L. Oberer, J. France, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9588–9590; h) J. S. Yadav, K. V. R. Rao, A. Kavita, D. K. Mohapatra, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 2849–2858; i) L. Radhika, S. Chandrasekhar, *Synth. Commun.* **2014**, *44*, 3602–3609; j) K. Suttisintong, J. D. White, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 2249–2262.
- [94] M. A. Gregory, M. Bobardt, S. Obeid, U. Chatterji, N. J. Coates, T. Foster, P. Gallay, P. Leyssen, S. J. Moss, J. Neyts, M. Nur-e-Alam, J. Paeshuyse, M. Pirae, D. Suthar, T. Warneck, M. Q. Zhang, B. Wilkinson, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 1975–1981.
- [95] a) G. Zenke, U. Strittmatter, S. Fuchs, V. F. Quesniaux, V. Brinkmann, W. Schuler, M. Zurini, A. Enz, A. Billich, J. J. Sanglier, T. Fehr, *J. Immunol.* **2001**, *166*, 7165–7171; b) R. Sedrani, J. Kallen, L. M. Martin Cabrejas, C. D. Papageorgiou, F. Senia, S. Rohrbach, D. Wagner, B. Thai, A.-M. Jutzi Eme, J. France, L. Oberer, G. Rihs, G. Zenke, J. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3849–3859.

- [96] K. H. Pua, D. T. Stiles, M. E. Sowa, G. L. Verdine, *Cell Rep.* **2017**, *18*, 432–442.
- [97] J. Kallen, R. Sedrani, G. Zenke, J. Wagner, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 21965–21971.
- [98] S. J. Moss, M. Bobardt, P. Leysen, N. Coates, U. Chatterji, D. J. Xie, T. Foster, J. L. Liu, M. Nur-e-Alam, D. Suthar, Y. S. Chen, T. Warneck, M. Q. Zhang, J. Neyts, P. Gallay, B. Wilkinson, M. A. Gregory, *MedChemComm* **2012**, *3*, 944–949.
- [99] S. J. Moss, M. A. Gregory, B. Wilkinson, C. J. Martin, WO 2011/098805A1, **2011**.
- [100] <https://www.prnewswire.com/news-releases/neurovive-acquires-highly-potent-novel-cyclophilin-inhibitors-from-biotech-196827741.html>.
- [101] S. J. Moss, M. A. Gregory, B. Wilkinson, US 9,139,613 B2, **2015**.
- [102] M. J. Hansson, S. J. Moss, M. Bobardt, U. Chatterji, N. Coates, J. A. Garcia-Rivera, E. Elmer, S. Kendrew, P. Leysen, J. Neyts, E. A. M. Nur, T. Warneck, B. Wilkinson, P. Gallay, M. A. Gregory, *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 285–292.
- [103] M. Bobardt, M. J. Hansson, P. Mayo, D. Ure, R. Foster, P. Gallay, *PLoS One* **2020**, *15*, e0237236.
- [104] S. Simón Serrano, A. Grönberg, L. Longato, K. Rombouts, J. Kuo, M. Gregory, S. Moss, E. Elmer, G. Mazza, P. Gallay, M. Pinzani, M. J. Hansson, R. Massoumi, *Cells* **2019**, *8*, 1409.
- [105] J. Kuo, S. S. Serrano, A. Grönberg, R. Massoumi, M. J. Hansson, P. Gallay, *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 1129.
- [106] a) V. A. Steadman, K. G. Poullennec, L. Lazarides, C. Aciro, D. K. Dean, A. J. Keats, D. S. Siegel, A. J. Schrier, R. Mackman, P. Jansa, WO 2013/185093A1, **2013**; b) V. A. Steadman, S. B. Pettit, K. G. Poullennec, L. Lazarides, A. J. Keats, D. K. Dean, S. J. Stanway, C. A. Austin, J. A. Sanvoisin, G. M. Watt, H. G. Fliri, A. C. Licican, D. Jin, M. H. Wong, S. A. Leavitt, Y. J. Lee, Y. Tian, C. R. Frey, T. C. Appleby, U. Schmitz, P. Jansa, R. L. Mackman, B. E. Schultz, *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 1000–1017; c) R. L. Mackman, V. A. Steadman, D. K. Dean, P. Jansa, K. G. Poullennec, T. Appleby, C. Austin, C. A. Blakemore, R. Cai, C. Cannizzaro, G. Chin, J. C. Chiva, N. A. Dunbar, H. Fliri, A. J. Highton, H. Hui, M. Ji, H. Jin, K. Karki, A. J. Keats, L. Lazarides, Y. J. Lee, A. Licican, M. Mish, B. Murray, S. B. Pettit, P. Pyun, M. Sangi, R. Santos, J. Sanvoisin, U. Schmitz, A. Schrier, D. Siegel, D. Sperandio, G. Stepan, Y. Tian, G. M. Watt, H. Yang, B. E. Schultz, *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 9473–9499.
- [107] K. J. Hale, J. Q. Cai, V. Delisser, S. Manaviazar, S. A. Peak, G. S. Bhatia, T. C. Collins, N. Jogiya, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 1047–1068.
- [108] J. Van Dyke-Blodgett, Y. Hu, US 2019/0002936A1, **2019**.
- [109] a) C. H. Heathcock, C. T. White, J. J. Morrison, D. Vanderveer, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 1296–1309; b) S. Masamune, W. Choy, J. S. Petersen, L. R. Sita, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 1–30; *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 1–31.
- [110] D. Guijarro, O. Pablo, M. Yus, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 5265–5270.
- [111] a) F. A. Davis, P. Zhou, B. C. Chen, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 13–18; b) M. T. Robak, M. A. Herbage, J. A. Ellman, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3600–3740.
- [112] I. Shiina, M. Kubota, H. Oshiumi, M. Hashizume, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 1822–1830.
- [113] C. C. Colpitts, S. Ridewood, B. Schneiderman, J. Warne, K. Tabata, C. F. Ng, R. Bartschlagler, D. L. Selwood, G. J. Towers, *eLife* **2020**, *9*, e52227.
- [114] J. L. Paulsen, H. S. Yu, D. Sindhikara, L. Wang, T. Appleby, A. G. Villasenor, U. Schmitz, D. Shivakumar, *J. Chem. Inf. Model.* **2020**, *60*, 3489–3498.
- [115] a) S. Daum, F. Erdmann, G. Fischer, B. Féaux de Lacroix, A. Hessamian-Alinejad, S. Houben, W. Frank, M. Braun, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7454–7458; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7615–7619; b) G. Fischer, C. Schiene-Fischer, S. Daum, G. Kuellertz, M. Braun, B. Féaux de Lacroix, WO2008019823, **2008**; c) B. Hernandez Alvarez, G. Fischer, M. Braun, A. Hessamian-Alinejad, H. Fliri, WO2003093258, **2003**; d) M. Braun, A. Hessamian-Alinejad, B. Féaux de Lacroix, B. Hernandez Alvarez, G. Fischer, *Molecules* **2008**, *13*, 995–1003.
- [116] For reviews, see: a) G. G. Xu, F. A. Etkorn, *Drug News Perspect.* **2009**, *22*, 399–407; b) R. Mathur, A. N. Bhatt, S. Gupta, B. S. Dwarakanath, *Front. Anti-Cancer Drug Discovery* **2013**, *2*, 226–263; c) J. D. Moore, A. Potter, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 4283–4291.
- [117] B. Féaux de Lacroix, Dissertation, Universität Düsseldorf, **2006**.
- [118] Zuordnung der absoluten Konfiguration von (*R*)- und (*S*)-1-Methyl-1-indancarbonsäure: H. des Abbayes, M. A. Boudeville, *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17*, 2137–2140. Bestätigung durch eine Kristallstruktur des dimeren (*R*)-Enantiomers, vgl. F. Kruska, Dissertation, Universität Düsseldorf, **2012**.



- [119] J. Pietruszka, R. C. Simon, F. Kruska, M. Braun, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 6217–6224.
- [120] Diese Beobachtung veranlasste uns, Ketone ohne stereogenes Zentrum in der α -Carbonylposition zu entwickeln, die interkonvertierbare Atropisomere bilden, vgl.: T. Hediger, W. Frank, M. Schumann, G. Fischer, M. Braun, *Chem. Biodiversity* **2012**, *9*, 2618–2634.
- [121] S. Daum, M. Schuhmann, S. Mathea, T. Aumüller, M. A. Basley, S. L. Constant, B. Féaux de Lacroix, F. Kruska, M. Braun, C. Schiene-Fischer, *Biochemistry* **2009**, *48*, 6268–6277.
- [122] S. V. Sambasivarao, O. Acevedo, *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 475–482.
- [123] J.-F. Guichou, J. Viaud, C. Mettling, G. Subra, Y.-L. Lin, A. Chavanieu, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 900–910.
- [124] A. Ahmed-Belkacem, L. Colliandre, N. Ahnou, Q. Nevers, M. Gelin, Y. Bessin, R. Brillet, O. Cala, D. Douguet, W. Bourguet, I. Krimm, J.-M. Pawlowsky, J.-F. Guichou, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12777.
- [125] S. Ni, Y. Yuan, J. Huang, X. Mao, M. Lv, J. Zhu, X. Shen, J. Pei, L. Lai, H. Jiang, J. Li, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5295–5298.
- [126] Die Darstellung der Strukturen von Verbindungen wie **55**, **56** und **57** in *trans-trans*-Konformation entspricht den in Lit. [123,125] publizierten. Für die Verbindungen **57** zeigte eine Dockingstudie die *trans-trans*-Konformation auf. Möglicherweise treten bei alternativen Konformationen sterische Schwierigkeiten bei der Orientierung der Substituenten auf.
- [127] a) Q. Nevers, I. Ruiz, N. Ahnou, F. Donati, R. Brillet, L. Softic, M. Chazal, N. Jouvenet, S. Fourati, C. Baudesson, P. Bruscella, M. Gelin, J. F. Guichou, J. M. Pawlowsky, A. Ahmed-Belkacem, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*; e00126; b) J. F. Guichou, L. Colliandre, H. Ahmed-Belkacem, J. M. Pawlowsky, WO2011076784, **2011**.
- [128] E. R. Shore, M. Awais, N. M. Kershaw, R. R. Gibson, S. Pandalaneni, D. Latawiec, L. Wen, M. A. Javed, D. N. Criddle, N. Berry, P. M. O'Neill, L.-Y. Lian, R. Sutton, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 2596–2611.
- [129] Das Diastereomer von Verbindung **73** mit (*S*)-Konfiguration am stereogenen Zentrum im Pyrrolidinring weist eine deutlich geringere Bindungsstärke auf: $K_d = 82 \mu\text{M}$.

- [130] K. Kajitani, M. Fujihashi, Y. Kobayashi, S. Shimizu, Y. Tsujimoto, K. Miki, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2008**, *70*, 1635–1639.
- [131] U. Grädler, D. Schwarz, M. Blaesse, B. Leuthner, T. L. Johnson, F. Bernard, X. Jiang, A. Marx, M. Gilardone, H. Lemoine, D. Roche, C. Jorand-Lebrun, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 126717.
- [132] A. De Simone, C. Georgiou, H. Ioannidis, A. A. Gupta, J. Juárez-Jiménez, D. Doughty-Shenton, E. A. Blackburn, M. A. Wear, J. P. Richards, P. N. Barlow, N. Carragher, M. D. Walkinshaw, A. N. Hulme, J. Michel, *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 542–547.
- [133] a) M. Panel, A. Ahmed-Belkacem, I. Ruiz, J. F. Guichou, J. M. Pawlowsky, B. Ghaleh, D. Morin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2021**, *376*, 348–357; b) M. Panel, I. Ruiz, R. Brillat, F. Lafdil, F. Teixeira-Clerc, C. T. Nguyen, J. Calderaro, M. Gelin, F. Allemand, J. F. Guichou, B. Ghaleh, A. Ahmed-Belkacem, D. Morin, J. M. Pawlowsky, *Gastroenterology* **2019**, *157*, 1368–1382.
- [134] C. Georgiou, I. McNae, M. Wear, H. Ioannidis, J. Michel, M. Walkinshaw, *J. Mol. Biol.* **2017**, *429*, 2556–2570.
- [135] a) K. R. Valasani, Q. R. Sun, D. Fang, Z. H. Zhang, Q. Yu, Y. P. Guo, J. P. Li, A. Roy, S. S. D. Yan, *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 294–299; b) K. R. Valasani, J. R. Vangavaragu, V. W. Day, S. S. Yan, *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54*, 902–912.
- Manuskript erhalten: 28. Januar 2022
Akzeptierte Fassung online: 15. März 2022
Endgültige Fassung online: 19. August 2022