
**Präklinische Wirkstoffentwicklung:
Assays zur Bewertung von Hemmstoffen des Hepatitis
C Virus Eintritts sowie von Inhibitoren der
Acetylcholinesterase und der 17 β -HSD1**

Dissertation

zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich - Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von

Dipl. Biol. Sigrid Ziegler

Saarbrücken

2008

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von März 2005 bis Dezember 2008 unter Anleitung von Prof. Dr. Rolf W. Hartmann am Institut für pharmazeutische und medizinische Chemie der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III der Universität des Saarlandes angefertigt.

Eingereicht am: _____ **17.02.2009**

an der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III der Universität des Saarlandes

1. Gutachter: _____ **Prof. Dr. R. W. Hartmann**

2. Gutachter: _____ **Prof. Dr. C. D. P. Klein**

der Dissertation mit dem Thema

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

des öffentlichen Promotionskolloquiums.

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Abstract

Worldwide 300 million people are infected with hepatitis C virus. The current therapy consisting of ribavirin and modified interferon fails in about 40 % of all cases.

The key proteins of viral infection are the viral envelope glycoprotein E2 and the human CD81-receptor. The knowledge of the interaction sites and the availability of X-ray structures make CD81 a promising drug target. *In silico* work indicates that the CD81-E2 interaction can be interrupted by small molecules. Based on this finding a FACS-based medium throughput assay was developed leading to compound classes with pronounced antiviral effect. This effect could be confirmed by experiments using HCV in cell culture.

The development of inhibitors of CYP11B2 as target for disorders like congestive heart failure and myocardial fibrosis led to new highly potent classes of inhibitors. Besides the examination of selectivity, inhibition of hepatic CYP enzymes, CYP17 and CYP19 were examined. Inhibition of acetylcholinesterase was determined in the course of this work. All compounds were inactive. Continuing *in vivo* examination can follow.

Concerning treatment of estrogen dependent diseases 17β -HSD1 has been evaluated as a promising target. New classes of non steroidal inhibitors with excellent pharmacokinetic and pharmacodynamic properties have been found. In the course of this work sequence alignments for a preselection of species were performed. Detection of inhibition concerning hamster 17β -HSD1 / 2 revealed that all tested compounds display a decrease of inhibition just as well as loss of selectivity. The proof of concept should be performed either in great apes or in further, more detailed investigated species.

Zusammenfassung

Weltweit sind 300 Millionen Menschen mit dem Hepatitis C Virus infiziert. Die gängige Therapie aus Ribavirin und Interferon greift in weniger als 60 % aller Fälle. Die Schlüsselproteine der viralen Infektion sind das virale Glykoprotein E2 und der humane CD81-Rezeptor. Die Kenntnis der beteiligten Aminosäuren und das Vorliegen von Röntgenkristallstrukturen machen CD81 zu einem vielversprechenden Ziel für die Hemmstoffentwicklung. *In silico* Untersuchungen zeigten, dass die CD81-E2 Interaktion durch kleine Moleküle unterbrochen werden kann. Darauf aufbauend wurde ein FACS-basierter Test entwickelt und Verbindungsklassen mit deutlichem antiviralem Effekt gefunden. Die Hemmwirkung konnte durch Untersuchungen an HCV in Zellkultur bestätigt werden.

Die Entwicklung von CYP11B2-Inhibitoren als Angriffspunkt in der Therapie chronischer Herzinsuffizienz und Myokardfibrose führte zu neuen hochpotenten Verbindungsklassen. Neben der Untersuchung auf Selektivität wurde auf Hemmung hepatischer CYP-Enzyme, der CYP17 und CYP19 untersucht. Die Hemmung der Acetylcholinesterase wurde im Rahmen dieser Arbeit bestimmt. Keine der untersuchten Verbindungen wies eine Hemmung auf. Weiterführende *in vivo* Untersuchungen können angeschlossen werden.

Bei der Behandlung estrogenabhängiger Erkrankungen wurde 17 β -HSD1 als vielversprechender Angriffspunkt evaluiert, für welchen neue Klassen nichtsteroidaler Hemmstoffen mit hervorragenden pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften gefunden wurden. Für das abschließende Proof of Concept wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Vorselektion nach Sequenz-Alignments vorgenommen. Hemmdaten bezüglich Hamster-17 β -HSD1 / 2 zeigten, dass alle getesteten Substanzen eine verminderte Hemmwirkung und einen Verlust der Selektivität aufwiesen. Das Proof of Concept sollte folglich an Menschenaffen oder an weiteren, detailliert untersuchten Spezies erbracht werden.

Liste der Publikationen

Diese wissenschaftliche Arbeit basiert auf folgenden Publikationen:

I. Development and Evaluation of a FACS-Based Medium Throughput Assay for HCV Entry Inhibitors

Ziegler S., Kronenberger B., Albrecht B., Kaul A., Gamer A.-L., Klein C. D., Hartmann R. W.

Revised manuscript submitted to Journal of Biomolecular Screening. **2009** Feb.

II. Structural Modifications of Salicylates: Inhibitors of Human CD81-Receptor HCV-E2 Interaction

Holzer M., Ziegler S., Neugebauer A., Kronenberger B., Klein C. D., Hartmann R. W.

Arch. Pharm. (Weinheim). **2008** Aug; *341*:478-84

III. Identification of Terfenadine as an Inhibitor of human CD81-Receptor HCV-E2 Interaction: Synthesis and Structure Optimization

Holzer M., Ziegler S., Albrecht B., Kronenberger B., Kaul A., Bartenschlager R., Kattner L., Klein C. D., Hartmann R. W.

Molecules. **2008** May 7; *13*:1081-110.

IV. Microwave-assisted Synthesis of Amino Acid Ester Substituted Benzoic Acid Amides: Potential Inhibitors of Human CD81-Receptor HCV-E2 Interaction

Holzer M., Ziegler S., Kronenberger B., Klein C. D., Hartmann R. W.

The Open Medicinal Chemistry Journal, **2008**, 2, 21-25

Contribution report

Dem Verfasser dieser Dissertation ist es ein Anliegen die Beteiligung an der Entstehung der Publikationen I. bis IV. darzustellen.

- I.** Der Verfasser war maßgeblich an der Planung und Strukturierung der Testoptimierungen und der Etablierung und Evaluierung des FACS-basierten Assays beteiligt. Er hat alle biologischen Tests durchgeführt und war maßgeblich an der Interpretation der Ergebnisse beteiligt. Der Verfasser hat das Manuskript zu dieser Publikation geschrieben. Die Synthese der Hemmstoffe wurde von Dr. Marcel Holzer durchgeführt.
- II.** Der Verfasser hat die biologische Testung durchgeführt, war maßgeblich an der Interpretation der Hemmdaten beteiligt, hat an der Syntheseplanung und an der Erstellung des Manuskriptes mitgewirkt. Die Synthese der Hemmstoffe wurde von Dr. Marcel Holzer durchgeführt.
- III.** Der Verfasser hat die biologische Testung durchgeführt, war maßgeblich an der Interpretation der Hemmdaten beteiligt, hat an der Syntheseplanung und an der Erstellung des Manuskriptes mitgewirkt. Die Synthese der Hemmstoffe wurde von Dr. Marcel Holzer durchgeführt.
- IV.** Der Verfasser hat die biologische Testung durchgeführt, war maßgeblich an der Interpretation der Hemmdaten beteiligt, hat an der Syntheseplanung und an der Erstellung des Manuskriptes mitgewirkt. Die Synthese der Hemmstoffe wurde von Dr. Marcel Holzer durchgeführt.

Abkürzungsverzeichnis

ACD	Available Chemicals Directory
AchE	Acetylcholinesterase
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
CD81	Tetraspanin 81
CLDN	Claudin
COX-2	Cyclooxygenase Typ 2
C-Terminus	Carboxyterminus
CYP	Cytochrom P450
CYP11B1	11 β -Hydroxylase
CYP11B2	Aldosteron-Synthase
CYP17	17 α -Hydroxylase-17,20-Lyase
CYP19	Aromatase
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
E1 / E2	Hüllproteine E1 / E2
EIA	Enzym-gekoppelter Immunoabsorptionstest
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ER +/-	Estrogenrezeptor positiv / negativ
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
HCV	Hepatitis C Virus
HCVcc	Hepatitis C in Zellkultur
HCVpp	Hepatitis C Pseudopartikel
HERG	Herg-Kanal
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HSD1 / 2	17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ I / II
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
INF	Interferon
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
Kb	Kilobase

kDa	Kilodalton
LEL	Große extrazelluläre Schleife von CD81
LDL(R)	(Rezeptor des) Lipoprotein geringer Dichte
MFI	Mittlere zellgebundene Fluoreszenzintensität
Mio.	Million
mRNA	Messenger RNA
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar
NAD(P)H	Nikotinamid Adenindinukleotid(phosphat)
NANBH	Non-A non-B Hepatitis
NCI	National Cancer Institute
NCR	Nicht kodierende Region
NS	Nicht-Strukturprotein
NSAID	Nichtsteroidale antiinflammatorische Wirkstoffe
N-Terminus	Aminoterminus
p7	p7-Protein
PAMP	Pathogen assoziierte molekulare Muster
PBMC	Periphere mononukleäre Zellen des Blutes
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PGE ₂	Prostaglandin E2
Ph	Phenyl
RNA	Ribonukleinsäure
SEL	kleine extrazelluläre Schleife von CD81
SR-BI	Scavenger-Rezeptor Klasse B Typ I
ssRNA	einzelsträngige RNA
TEM	Tetraspanin angereicherte Mikrodomänen
TLR	Toll-like Rezeptor
TM	Transmembrandomäne
TMA	Transkription-vermittelte Amplifikation
VLDL	Lipoprotein sehr geringer Dichte
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

Abstract	IV
Zusammenfassung	V
Liste der Publikationen	VI
Contribution Report	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Vorwort	1
2. Einleitung	2
2.1. Hepatitis C Virus	2
2.1.1. Geschichtlicher Hintergrund	2
2.1.2. Taxonomie	3
2.1.3. Morphologie	3
2.1.4. Aufbau des viralen Genoms	3
2.1.5. HCV-Proteine: Strukturproteine	5
2.1.5.1. Core-Protein	5
2.1.5.2. Hüllproteine E1 und E2	5
2.1.6. HCV-Proteine: Nicht-Strukturproteine (NS)	5
2.1.6.1. p7-Protein	5
2.1.6.2. NS2	6
2.1.6.3. NS3 and NS4A	6
2.1.6.4. NS4B	7
2.1.6.5. NS5A	7
2.1.6.6. NS5B	7
2.1.7. Viraler Lebenszyklus	7
2.1.7.1. Initiation	8
2.1.7.2. Replikation	9
2.1.7.3. Ausschleusung	9
2.1.8. Hepatitis C: Epidemiologie, Pathogenese und Symptome	9
2.1.9. Diagnose	10
2.1.10. Therapie	10
2.1.11. Potentielle Angriffspunkte und Hemmstoffe in der Hepatitis C Therapie	11
2.1.11.1. Protease-Inhibitoren	12
2.1.11.2. Polymerase-Inhibitoren	13
2.1.11.3. Immunmodulatoren	13
2.1.11.4. Weitere Targets	14
2.1.11.5. Fusionsinhibitoren	14

2.1.12.	CD81-Rezeptor als potentielles Target _____	14
2.1.13.	Hemmung des CD81-vermittelten Hepatitis C Virus Zelleintritts _____	16
2.1.13.1.	Virtuelles Screening _____	17
2.1.13.2.	Biologisches Testsystem _____	17
2.2.	Acetylcholinesterase (E.C.3.1.1.7) _____	19
2.2.1.	Klassifizierung der Acetylcholinesterase _____	20
2.2.2.	Vorkommen und biologische Funktion der Acetylcholinesterase _____	20
2.2.3.	Bedeutung der AChE bei der Weiterleitung eines Aktionspotenzials _____	20
2.2.4.	Katalytischer Mechanismus der Acetylcholinesterase _____	21
2.2.5.	AChE-Hemmer als Therapeutika _____	22
2.2.6.	Hemmstoffe der Acetylcholinesterase _____	23
2.3.	17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ I (17 β -HSD1) _____	24
2.3.1.	Steroidhormone _____	24
2.3.2.	Klassifizierung der 17 β -HSD1 _____	24
2.3.3.	Vorkommen und biologische Funktion der 17 β -HSD1 _____	25
2.3.4.	Postulierter katalytischer Mechanismus _____	25
2.3.5.	Endometriose _____	26
2.3.5.1.	Pathogenese _____	26
2.3.5.2.	Therapie _____	27
2.3.5.3.	Endometriose und 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase _____	27
2.3.7.	Brustkrebs _____	29
2.3.7.1.	Pathogenese _____	29
2.3.7.2.	Therapie _____	29
2.3.7.3.	Brustkrebs und 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase _____	30
3.	Zielsetzung der vorliegenden Dissertation _____	31
4.	Ergebnisse _____	33
4.1.	Development and Evaluation of a FACS-Based Medium Throughput Assay For HCV Entry Inhibitors _____	33
4.2.	Structural Modifications of Salicylates: Inhibitors of Human CD81-Receptor HCV-E2 Interaction _____	47
4.3.	Identification of Terfenadine as an Inhibitor of Human CD81-Receptor HCV-E2 Interaction: Synthesis and Structure Optimization _____	60
4.4.	Microwave-Assisted Synthesis of Amino Acid Ester Substituted Benzoic Acid Amides: Potential Inhibitors of Human CD81-Receptor HCV-E2 Interaction _____	91
4.5.	Ergebnisse: Teilprojekt Acetylcholinesterase _____	99
4.6.	Ergebnisse: Teilprojekt 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ I _____	101

5. Experimenteller Teil	104
5.1. Hepatitis C Virus	104
5.2. Acetylcholinesterase	104
5.3. 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ I	106
5.3.1. Isolierung der humanen 17 β -HSD1 aus humaner Plazenta	106
5.3.2. Zellfreier Kompetitionsassay an humaner 17 β -HSD1	106
5.3.3. Zellfreier Kompetitionsassay an humaner 17 β -HSD2	107
6. Zusammenfassung und Diskussion: Hepatitis C Virus	108
7. Referenzen	121
8. Danksagungen	137

1. Vorwort

Dank intensiver Forschung und dem Einsatz von Summen in Milliardenhöhe für die Entwicklung neuer Arzneimittel sind heute viele Krankheiten die noch in dem letzten Jahrhundert eine enorme Bedrohung darstellten, unproblematisch zu therapieren oder sogar ausgerottet. Dennoch gibt es immer noch viele Erkrankungen, die lediglich unzufriedenstellend behandelt werden können.

Die Herausforderung einen neuen Arzneistoff zur Zulassung zu bringen, spiegelt sich in der Dauer und der Komplexität der Entwicklung von Wirkstoffen wider. Im Gegensatz zu der intuitiven, auf logischen Schlussfolgerungen und den Ergebnissen aus Tierversuchen basierenden Arzneimittelforschung bis weit in das 20. Jahrhundert hinein, bedient man sich heute systematischeren Methoden, die auf genombasierter Forschung, kombinatorischer Chemie, *in vitro* Hochdurchsatz-Testmethoden und auch computergestützten rationalen Designs basieren.

Es wird grundsätzlich zwischen einer präklinischen und einer klinischen Phase der Entwicklung unterschieden. Die präklinische Phase basiert auf der Targetfindung und dessen Validierung sowie der anschließenden erfolgreichen Suche nach Substanzen, die eine gewisse Aktivität aufweisen, sogenannte hits oder Treffer. Diese werden wiederum zur Generierung einer Leitverbindung mit verbessertem Wirkprofil, d.h. gesteigerter Potenz, Selektivität sowie Bioverfügbarkeit und verminderten toxischen und unerwünschten Nebenwirkungen verwendet. Die präklinische Phase findet ihren Abschluss mit der Untersuchung pharmakodynamischer sowie pharmakokinetischer Prozesse.

In den daran anschließenden klinischen Phasen werden zunächst an gesunden Probanden und schließlich an erkrankten Patienten Wirksamkeit, Sicherheit und Verträglichkeit des Wirkstoffs geprüft, bis er schließlich zugelassen und auf dem Markt eingeführt werden kann.

Die nun folgende Arbeit wird sich in dem Hauptteil mit der ersten Phase der Vorklinik bei der Suche nach Protein-Protein-Interaktionshemmstoffen zwischen Hepatitis C Virus und Wirtszelle beschäftigen. In dem darauf folgenden Teilprojekt liegt der Fokus auf der anschließenden Entwicklungsphase der gefundenen wirksamen Substanzen, geprägt durch die Untersuchung von off target-Effekten von Wirkstoffen an dem Enzym Acetylcholinesterase. Das letzte Teilprojekt ist in der letzten Phase der Vorklinik anzusiedeln und beschäftigt sich im Rahmen der Suche nach einem geeigneten Tiermodell zum Nachweis des proof of principle eines Wirkstoffes mit Speziesunterschieden bei der 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ I (17 β -HSD1).

2. Einleitung

2.1. Hepatitis C Virus

Ein Virus ist ein submikroskopisches, parasitäres und infektiöses Agens, welches nicht fähig ist außerhalb einer Wirtszelle zu leben oder sich eigenständig zu vermehren. Im Jahre 1899 entdeckte der Mikrobiologe Martinus Beijerinck das erste Virus, das Tabak Mosaik Virus.¹ Seitdem konnten tausende weiterer Viren identifiziert werden, von denen die meisten Auslöser mehr oder weniger schwerwiegender Erkrankungen sind.

Bezogen auf die Inzidenz, die Pathogenese und Sterblichkeit, sind die hervorstechendsten Viren das humane Immundefizienz-Virus (HIV) sowie das Hepatitis C Virus (HCV) (siehe Tab. 1).

Tabelle 1: Übersicht über Inzidenz und Mortalität von HCV sowie HIV gemäß WHO bezogen auf das Jahr 2007.

	HCV	HIV
Inzidenz	aufgrund asymptomatischen Verlaufs einer akuten Infektion keine genaue Bestimmung möglich	~ 2.5 Mio.
Infektionen weltweit	~ 170 Mio. (chronisch)	~ 33.2 Mio.
Mortalität	~ 60-80 % der chronisch Infizierten entwickeln Leberzirrhose mit einer Todeshäufigkeit von 5-7 %	~ 2.1 Mio.

2.1.1. Geschichtlicher Hintergrund

Mitte der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts war bereits bekannt, dass neben Hepatitis A und B Virus ein weiterer Auslöser viraler Hepatitis (*griech.* hepar: Leber; *griech.* itits: Entzündung) existiert, da das Serum einiger Patienten negativ für immunologische Marker der beiden bekannten Hepatitis Viren war. Das noch unbekannt Virus wurde zu diesem Zeitpunkt non-A non-B Hepatitis (NANBH) genannt.^{2,3}

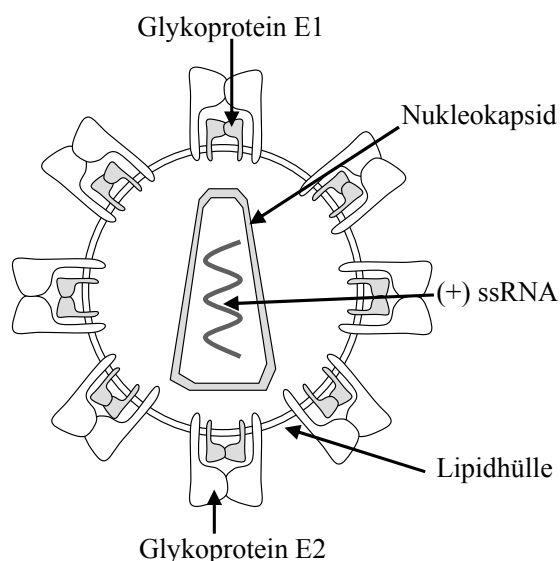
1989 gelang es Choo et al.⁴ zum ersten Mal eine Polynukleotidsequenz dieses Virus aus dem Plasma infizierter Schimpansen zu isolieren. Diese Arbeit und die darin veröffentlichte Methode HCV-RNA nachzuweisen bildeten die Grundlage für ein diagnostisches Verfahren das genutzt wurde, um eine breitgestreute Untersuchung von verfügbaren Blutproben durchzuführen, was erstmals die Dimension dieser Erkrankung offenbarte.⁵

2.1.2. Taxonomie

Das Hepatitis C Virus wird innerhalb der Familie der Flaviviridae der Gattung der Hepaciviren zugeordnet.⁶ Es handelt sich um ein behülltes RNA-Virus, dessen Genom als einzelsträngige RNA mit Plusstrangorientierung vorliegt. Das Genom wird durch eine virale RNA-abhängige RNA-Polymerase vervielfältigt, die keine Korrekturlesefunktion besitzt. Dies resultiert in einer hohen Mutationsrate (Mutationswahrscheinlichkeit 10^{-3} bis 10^{-4}) im Vergleich zu Enzymen mit 3'-5'-Exonukleasefunktion (Mutationswahrscheinlichkeit 10^{-9}). Dies führt dazu, dass das Hepatitis C Virus als Population aus verwandten aber dennoch leicht unterschiedlichen Genomen, den sogenannten Quasispezies vorliegt.⁷

Basierend auf Sequenzanalysen konnten sechs Hauptgenotypen (1-6), zwölf Subtypen und unzählige Quasispezies des Hepatitis C Virus identifiziert werden. Die Verteilung der Genotypen zeigt geographische Unterschiede. Die Genotypen 1 bis 3 treten weltweit auf, wohingegen die Genotypen 4 bis 6 eine deutliche Fokussierung auf Südafrika, Ägypten sowie Hongkong zeigen.⁸

2.1.3. Morphologie



Das Hepatitis C Virus hat einen Durchmesser von ungefähr 50 nm und setzt sich aus einer von der Wirtszelle abgeleiteten Hüllmembran mit den integrierten Glykoproteinen E1 sowie E2 zusammen.⁹ Die virale (+) ssRNA wird von dem Nukleokapsid umgeben, dessen Geometrie nicht abschließend geklärt ist. Im Plasma liegt HCV als Komplex gebunden an LDL (low density lipoprotein) sowie VLDL (very low density lipoprotein) vor.¹⁰

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Hepatitis C Virus. Das Kapsid ist von einer Membranhülle umgeben, in welche die Oberflächenproteinen E1 und E2 eingelagert sind. Im Inneren des Kapsids befindet sich das einzelsträngige (ss) virale RNA-Genom.

2.1.4. Aufbau des viralen Genoms

Das HCV Genom ist ein einzelsträngiges RNA-Molekül mit positiver Polarität und einer Größe von ungefähr 9.6 kb. Das Genom besteht aus einem offenen Leseraster, welches für ein

Vorläuferpolyprotein aus ungefähr 3010-3033 Aminosäuren kodiert. Dieser Bereich wird flankiert von zwei stark konservierten nicht kodierenden Regionen (NCR: non-coding region).^{11, 12} Die 5'-NCR, eine stark konservierte Region, beinhaltet eine IRES (internal ribosomal entry site) -Sequenz, die an die ribosomale 40S-Untereinheit binden kann, ohne dafür weitere Initiationsfaktoren der Translation zu benötigen.¹³ Die 3'-NCR hingegen scheint durch Interaktion mit der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase eine essentielle Rolle bei der Replikation der viralen RNA zu spielen.¹⁴

Das aus dem offenen Leserahmen gebildete Polyprotein unterliegt ko- sowie posttranslationaler Spaltung durch wirtseigene aber auch durch virale Proteasen. Dabei entstehen aus dem 5'-Bereich des offenen Leserahmens die sogenannten Strukturproteine, gebildet aus dem Kapsidprotein sowie den Hüllproteine E1 und E2, die das virale Partikel bilden. Der 3'-terminalen Bereich hingegen kodiert für die sogenannten Nicht-Strukturproteine, die sich aus dem p7 Ionenkanalprotein, der NS2-3 Protease, der NS3 Serinprotease, der RNA-Helikase, dem NS4B Polypeptid, dem NS4B, dem NS5A Protein und der NS5B RNA-abhängige RNA-Polymerase zusammensetzen.^{15, 16}

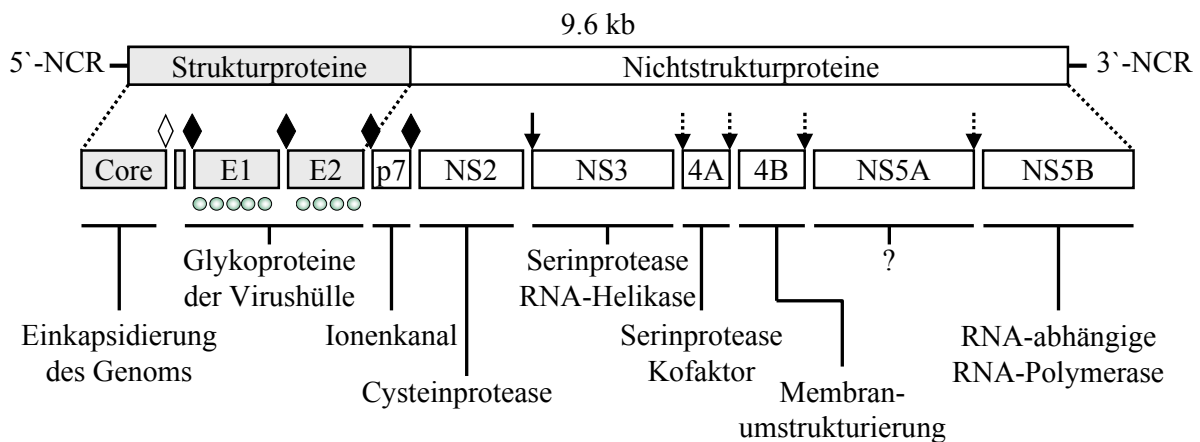


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Organisation des Hepatitis C Virus Genoms und der Polyproteinprozessierung:¹⁷ Das HCV Genom mit den 5' und 3' nichtkodierenden Regionen (NCR) ist im oberen Teil der Abbildung dargestellt. Eine Übersicht über die Organisation des HCV Vorläuferpolyproteins und dessen Prozessierung sowie über die Funktion der einzelnen HCV-Proteine ist im unteren Teil der Abbildung dargestellt.

Legende:

- ◆ Spaltung durch wirtseigene Signalpeptidasen des ER
- ◇ C-terminale Prozessierung des Core-Proteins durch Signalpeptidasen
- ⇓ Spaltung durch virale NS2-NS3 Protease
- ↓ Spaltung durch virale NS3-4A Protease
- Glykosylierung
- NCR nicht kodierende Region

2.1.5. HCV-Proteine: Strukturproteine

2.1.5.1. Core-Protein

Das Core-Protein ist ein RNA-bindendes Protein, das die Kapsidhülle des viralen Partikels bildet. Die genomische Sequenz des Core-Proteins ist unter allen bekannten Hepatitis C Virusstämmen hoch konserviert.¹⁸ Es handelt sich um eine Anhäufung von basischen Proteindomänen, die zur nichtkovalenten Bindung an die negativ geladene virale Nukleinsäure notwendig sind.

Da virale Genome in ihrer Größe eingeschränkt sind, muss die Information, für die sie kodieren, mit höchster Effizienz genutzt werden. Das Core-Protein beispielsweise interagiert mit zahlreichen zellulären Proteinen und beeinflusst somit ebenfalls unzählige zelluläre Funktionen des Wirtes.¹⁹⁻²¹ Dazu gehören unter anderem die Translation,²² regulatorische Funktionen,^{19, 20} aber auch zelluläre Prozesse wie beispielsweise die Apoptose,²³ das Zellwachstums und die Zellveränderung.²⁴ Es konnte gezeigt werden, dass das Protein ebenso eine entscheidende Rolle bei dem geschickten Umgehen der wirtseigenen Immunantwort spielt.²⁵

2.1.5.2. Hüllproteine E1 und E2

Die Hüllproteine E1 und E2 sind Transmembranproteine, die sich als nichtkovalent gebundene Heterodimere zusammenlagern.²⁶ Ihre Ektodomäne liegt modifiziert mit N-verbundenen Glykanen vor, die eine Rolle bei der Faltung der HCV-Glykoproteine oder aber beim Eintritt des Virus in die Wirtszelle zu spielen scheinen.²⁷ Diese beiden Proteine haben grundlegende Bedeutung für verschiedene Schritte des viralen Lebenszykluses, wie beispielsweise für den Eintritt des Virus in die Wirtszelle^{28, 29} aber auch für die Zusammenlagerung der infektiösen Partikel.⁹

2.1.6. HCV-Proteine: Nicht-Strukturproteine (NS)

2.1.6.1. p7-Protein

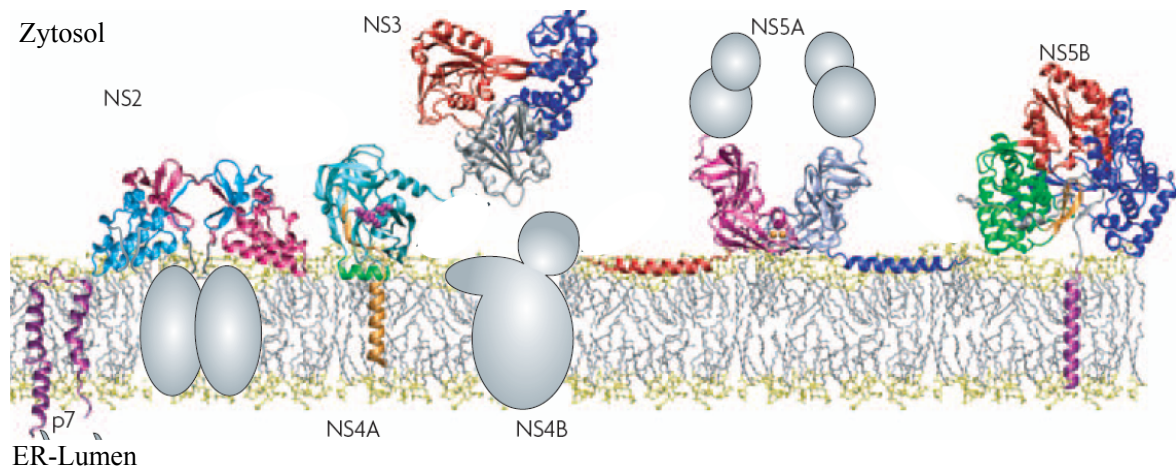
Das p7-Polypeptid ist ein kleines membrangebundenes Protein, welches aus zwei Transmembrandomänen, einer kurzen zytoplasmatischen Schleife sowie einem zum Lumen des endoplasmatischen Retikulum hin orientierten N- und C-Terminus, besteht.³⁰ Auch wenn die Funktion des p7-Proteins noch nicht abschließend aufgeklärt ist, geben Untersuchungen an künstlichen Membranen Hinweise darauf, dass es sich um einen Ionenkanal handelt.³¹⁻³³

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass p7 essentiell für die Infektiosität von Hepatitis C Viren in Schimpansen ist.³⁴

2.1.6.2. NS2

Das Nicht-Strukturprotein NS2 ist ein integrales Membranprotein, dessen Funktion in seiner reifen Form nicht bekannt ist. Bislang konnte gezeigt werden, dass NS2 nicht essentiell für die Bildung des Replikationskomplexes ist.^{35, 36} Vor dem Abspalten von dem Polyprotein trägt NS2 zu einer Proteasefunktion bei, die durch Autoproteolyse der NS2/NS3-Verbindungen die Freisetzung von NS2 vollzieht.³⁷ Zusätzlich wird dem NS2-3 Enzym eine Cystein-Proteinase Aktivität zugeschrieben.³⁸

Einige der publizierten Daten legen die Vermutung nahe, dass zusätzlich zu seiner Bedeutung bei der Prozessierung an der NS2/NS3 Spaltstelle, NS2 in den Zusammenbau der viralen Partikel sowie deren Freisetzung involviert ist.³⁹⁻⁴¹ Ebenso gibt es Hinweise darauf, dass NS2 einen Effekt auf die zelluläre Transkription haben könnte.⁴²



Moradpour et al. 2007

Abbildung 3: Organisationsstruktur (Homo/Hetero-Monomer/Dimer) und Membranverknüpfung der Nicht-Strukturproteine des Hepatitis C Virus sowie deren Orientierung in der Membran des endoplasmatischen Retikulum¹⁷

2.1.6.3. NS3 and NS4A

Das Nicht-Strukturprotein NS3 ist ein pluripotentes Protein mit einer N-terminalen Proteasedomäne vom Typ Serinprotease und einer C-terminalen RNA-Helikase / NTPase-Domäne. Das Nicht-Strukturprotein NS4A ist ein Membranprotein, welches mit NS3, einem durch NS4A Membran-assoziierten Protein, den NS3-4A Komplex bildet (Abb. 3).

Dieser Komplex setzt die einzelnen Komponenten der viralen RNA-Replikation durch Spaltung downstream von NS3 frei.⁴³

NS3 beinhaltet eine RNA-Helikase Funktion, die das Protein befähigt RNA-RNA Duplices zu entwinden.⁴⁴ Die Bedeutung dieser Funktion für den viralen Lebenszyklus ist noch unklar. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass NS3 mit diversen zellulären Proteinen interagiert²¹ und es wird vermutet, dass es an der Konversion einer infizierten Zelle zur Krebszelle beteiligt ist.⁴⁵ Das Membranprotein NS4A, der Cofaktor von NS3, verstärkt dessen proteolytische Aktivität und erhöht dessen metabolische Stabilität.⁴⁶ NS4A trägt maßgeblich zur korrekten Faltung von NS3 bei⁴⁷ und verankert das nichtkovalent gebundene NS3 an der Membran. Zusätzlich blockiert der NS3-4A Proteinkomplex die antivirale Antwort der Wirtszelle durch Interaktion mit dem Signalweg, der doppelsträngige RNA als PAMP (pathogen associated molecular pattern) erkennt und eine antivirale Antwort auslöst.⁴⁸

2.1.6.4. NS4B

Das NS4B ist ein Transmembranprotein (Abb. 3),⁴⁹ welches C-terminal kovalent mit Palmitinsäureresten verknüpft vorliegt.⁵⁰ Es induziert intrazelluläre Umstrukturierungen von Membranen, die die virale Replikation unterstützen.⁵¹ NS4B weist zudem ein Nukleotidbindendes Motiv auf, welches Einfluss auf die Replikation des Hepatitis C Virus hat.⁵²

2.1.6.5. NS5A

Das NS5A-Protein ist ein Membran-assoziiertes Protein, welches eine N-terminale amphipatische α -Helix aufweist, die als Membrananker dient (Abb. 3).^{53, 54} Dem Nicht-Strukturprotein NS5A wird als Zink-bindendem Phosphoprotein eine essentielle Rolle in der Replikation des Hepatitis C Virus zugeschrieben.^{55, 56} Es moduliert möglicherweise die Interferonantwort infizierter Zellen⁵⁷ und interagiert mit zahlreichen Signalwegen der Wirtszelle.^{21, 58, 59}

2.1.6.6. NS5B

NS5B ist ein Membran-assoziiertes Protein mit einer C-terminalen Transmembrandomäne (Abb. 3).⁶⁰ Als RNA-abhängige RNA-Polymerase kann NS5B virale Genome auf der Basis von RNA als Template synthetisieren. Seine Polymeraseaktivität wird durch weitere virale Proteine wie beispielsweise NS3 und NS5A moduliert.⁶¹ Des Weiteren interagiert NS5B mit einer Reihe weiterer zellulärer Proteine.⁶²⁻⁶⁴

2.1.7. Viraler Lebenszyklus

Der virale Lebenszyklus kann grundsätzlich in drei Abschnitte unterteilt werden. Die Initiation, der erste Schritt des viralen Lebenszyklus beinhaltet die Anlagerung des Virus an

die Wirtszelle, das Eindringen und die Freisetzung des viralen Genoms.

Die Initiation wird gefolgt von der Replikation, die die Replikation des viralen Genoms, die Transkription und Proteinbiosynthese sowie die dazu gehörigen posttranslationalen Modifikationen einschließt. Auf die Initiation und Replikation folgt der Austritt des Virus aus der Zelle, der den Zusammenbau, die Freisetzung und schließlich die Reifung der viralen Partikel zu infektiösen Viren umfasst.

2.1.7.1. Initiation

Die bevorzugten Wirtszellen für Hepatitis C Viren sind Leberzellen, allerdings konnte virale RNA auch in PBMCs (periphere, mononukleäre Zellen des Blutes) und mehreren B- und T-Zelllinien nachgewiesen werden.

Virale Partikel, die im Blut zirkulieren, liegen als Komplexe aus Virus und Lipoproteinen vor, die an Rezeptoren der Wirtszellen wie beispielsweise Glykosaminoglykane^{65, 66} und/oder den LDL-R (low density Lipoproteinrezeptor) binden können.⁶⁷ Dieser einleitende Schritt wird gefolgt von der Interaktion mit spezifischen Zelleintrittsfaktoren, die eine hohe Affinität zu den Hepatitis C Viren haben. Einer der ersten Faktoren, der in diesem Zusammenhang entdeckt wurde, ist das Tetraspanin CD81, welches mit dem viralen E2 Glykoprotein interagiert.⁶⁸ Tiefgreifende Untersuchungen zu diesem Thema haben bestätigt, dass CD81 in Assoziation mit TEMs (Tetraspanin enriched domains)^{69, 70} zwar für den Eintritt des Virus in die Wirtszelle notwendig aber nicht alleine ausreichend ist.

Weitere Faktoren wie beispielsweise der Scavenger Rezeptor Klasse B Typ I (SR-BI),⁷¹ das tight junctions Protein Claudin-1 (CLDN1),⁷² aber auch weitere Mitglieder der CLDN-Familie wie CLDN6 und 9 scheinen in den viralen Eintritt verwickelt zu sein.⁷³ Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Hepatotropismus des Virus durch das Fehlen von EWI-2wint, einem Immunoglobulin ähnlichen Protein, bedingt wird.⁷⁴

Das Anheften an die Wirtszelle und das Binden an spezifische Eintrittsfaktoren wird gefolgt von Clathrin-vermittelter Endozytose der viralen Partikel.⁷⁵ Die Änderung des pH-Wertes in den Endosomen führt zu einer konformationellen Änderung des E1 / E2 Heterodimers. Diese wiederum hat zur Folge, dass es zu einer Verschmelzung mit der endosomalen Membran kommt, so dass das virale Genom in das Zytosol freigesetzt werden kann.^{66, 75-79}

Auch wenn bereits vieles über die Proteine bekannt ist, die an dem Eintritt des Virus in die Zelle beteiligt sind, so ist deren präzise Interaktion und Wirkungsweise noch nicht abschließend geklärt.

2.1.7.2. Replikation

Die Replikation von HCV und aller verwandten Viren findet ausschließlich im Zytoplasma der Wirtszelle unter strikter Anbindung an intrazelluläre Membranen statt. Da die HCV-RNA Plusstrangorientierung (5' nach 3') aufweist, kann sie als mRNA verwendet und direkt in Protein umgeschrieben werden.

Die 5' nicht-kodierende Region beinhaltet eine interne Ribosomen-Eintrittsstelle, die eine cap-unabhängige Translation der viralen RNA ermöglicht.¹⁷ Die Translation des offenen Leserasters führt zu einem großen Polyprotein, einem Vorläuferprotein, welches zunächst durch ko- und posttranslationale Modifikationen zu den entsprechenden reifen Proteinen umgewandelt werden muss.

Das virale Genom selbst wird durch die viral kodierte RNA-abhängige RNA-Polymerase vervielfältigt, wobei weitere virale Replikasen wie beispielsweise das Zink-bindende Phosphoprotein NS5A entscheidend daran beteiligt sind.

2.1.7.3. Ausschleusung

Aufgrund des Fehlens von geeigneten Systemen, um die viralen Prozesse detailliert untersuchen zu können, ist wenig über die späten Schritte des viralen Lebenszyklus wie beispielsweise die Verpackung, den Zusammenbau und das Ausschleusen der Viren bekannt. Fest steht allerdings, dass Virionen von dem ER bzw. von ER-abgeleiteten Kompartimenten zu Knospen scheinen und virale Partikel über den sekretorischen Weg freigesetzt werden.⁸⁰ Eine für die endgültige Aufklärung dieser Mechanismen vielversprechende Entwicklung stellt die Etablierung von HCV Pseudopartikeln sowie HCV in Zellkultur dar.

2.1.8. Hepatitis C: Epidemiologie, Pathogenese und Symptome

Unter Hepatitis versteht man eine systemische Erkrankung, genauer eine Entzündung der Leber, die sowohl durch Bakterien, Drogenmissbrauch, Alkohol aber auch Viren verursacht werden kann. Virale Hepatitis ist eine der häufigsten Infektionskrankheiten weltweit. Global gesehen sind etwa 200 Millionen Menschen chronisch mit HCV infiziert (World Health Organisation) und etwa 3 bis 4 Millionen Menschen werden jährlich neu infiziert. Die Hauptursache für eine Infektion sind Blut sowie Blutprodukte, so dass Transfusionen, Transplantationen und Dialyse als Hauptinfektionswege gelten. Daneben werden aber auch intravenöser Missbrauch von Drogen, Geschlechtsverkehr, Piercing und Tätowierungen als mögliche Infektionswege aufgeführt.⁸¹

Die Inkubationszeit beträgt je nach Virustyp zwischen zwei Wochen und einem halben Jahr. Diese symptomfreie Zeit wird gefolgt von einem drei bis vier Tage andauernden Prodromalstadium, in dem Patienten an Müdigkeit, Übelkeit, Unterleibsschmerzen und grippeähnlichen Symptomen leiden. In den seltensten Fällen tritt die typischerweise mit Hepatitis verbundene Gelbsucht auf. An dieses Stadium kann sich ein ein- bis vierwöchiges ikterisches Stadium anschließen, das durch dunklen Urin, entfärbte Ausscheidungen und Juckreiz gekennzeichnet ist.⁸²

Eine persistierende Virämie tritt spätestens 6 Monate nach der Erstinfektion auf. Ungefähr 50 bis 85 % derer, die eine akute Infektion aufweisen, entwickeln chronische Hepatitis.⁸³ Diese wird nicht durch eine direkte Zerstörung der Leberzellen durch das Virus verursacht, sondern durch die induzierte Immunantwort, die so stark ist, dass sie eine Zerstörung der Hepatozyten bewirkt, aber nicht stark genug ist, um eine vollständige Beseitigung der Virenlast zu gewährleisten.⁸⁴ Nach 20 bis 30 Jahren chronischer Infektion entwickeln etwa 50 % der Patienten Fibrosen und 20 % Zirrhosen, von denen wiederum jährlich 1-4 % hepatozelluläre Karzinome entwickeln.⁸²

2.1.9. Diagnose

Die Diagnose einer Hepatitis C Infektion erfolgt durch biochemische Untersuchung verschiedener Leberfunktionen. Diese schließt die Bestimmung von Gesamt- und direktem Bilirubin, der ALT (Alanin-Aminotransferase), der AST (Aspartat-Aminotransferase), der alkalischen Phosphatase, der Prothrombinzeit, als Maß für die Blutgerinnung, des Gesamtproteingehaltes, von Albumin, Globulin sowie ein vollständiges Blutbild ein.

Ebenso ist sie abhängig von dem Nachweis von Antikörpern, die 6-8 Wochen nach Infektion durch EIA (enzyme immuno assay) festgestellt werden können. Zur Diagnose wird der Nachweis viraler RNA mittels PCR (Polymerase Kettenreaktion) herangezogen.

2.1.10. Therapie

Die Indikation, die Dauer der Behandlung, die Dosierung von Ribavirin und der Aufzeichnungsmodus der viralen Last sind abhängig von dem Genotyp der Infektion.⁸⁵

Die Standardtherapie bei chronischer Hepatitis C besteht aus einer Kombination aus pegyliertem Interferon alpha (INF α) beziehungsweise Albuferon und Ribavirin über einen Zeitraum von 24 bis 48 Wochen.⁸⁶ Bei Genotyp 1 sowie 4-6 wird eine Behandlungsdauer von 48 Wochen präferiert, da dies zu einer signifikanten Steigerung der anhaltenden Responserate führt. Dahingegen werden die Genotypen 2 und 3 über einen vergleichsweise kurzen Zeitraum von 24 Wochen einer Interferontherapie unterzogen.⁸⁵

INF α induziert einen Virus-unspezifischen antiviralen Zustand der Zelle und stimuliert als Immunmodulator das angeborene und adaptive Immunsystem. Ebenso weist es antiproliferative, antiangiogenetische aber auch antitumorale Eigenschaften auf.⁸⁷ Die Wirkungsweise von Ribavirin, einem Guanosin-Analogon, ist noch nicht vollständig geklärt, scheint aber auf der Einführung von letalen Mutationen zu beruhen.⁸⁸

Die kovalente Verknüpfung mit Polyethylenglykol (PEG) bzw. Albumin bewirkt eine Verlängerung der Halbwertszeit, eine verbesserte Pharmakokinetik und somit ein besseres Ansprechen. Durch die Einführung von PEG-INF α konnte die Gabe von dreimal auf einmal wöchentlich reduziert werden. Albuferon kann hingegen sogar nur noch alle 14-Tage verabreicht werden und führt somit zu einer spürbaren Entlastung der betroffenen Patienten.

Ein Patient gilt als geheilt, wenn keine HCV-RNA mehr im Serum nachgewiesen werden kann. Die verwendete Detektionsmethode hat ein Limit unter 50 Infektionseinheiten / ml. Man spricht von einem anhaltenden virologischen Ansprechen, wenn 24 Wochen nach Ende der Behandlung immer noch keine HCV-RNA detektierbar ist.⁸⁶

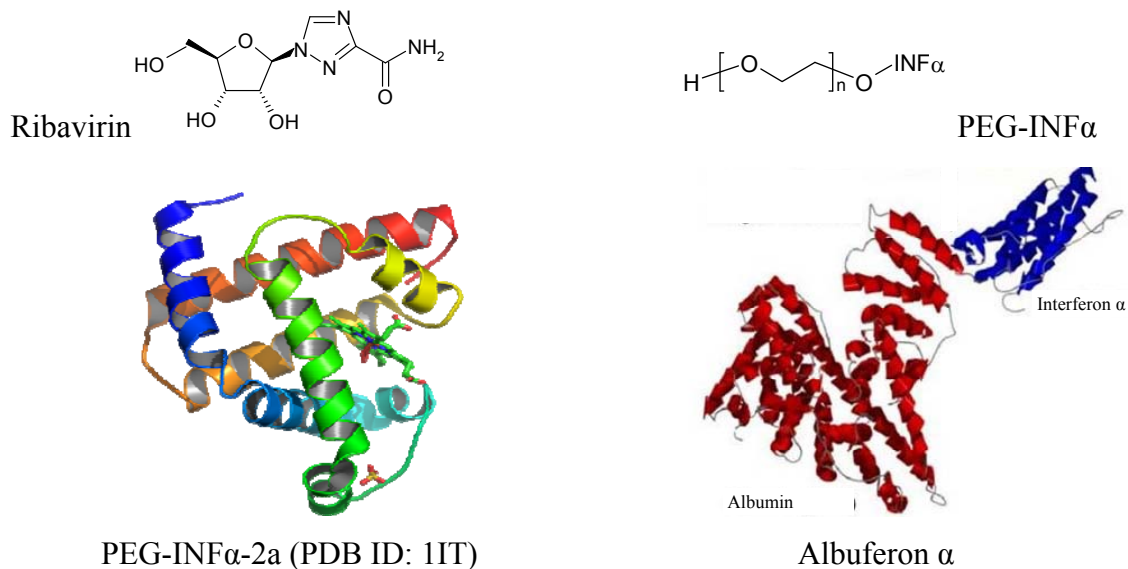


Abbildung 4: Darstellung der Strukturformeln von Ribavirin, PEG-INF α sowie der 3D-Strukturen von humanem PEG-INF α -2a (60 kDa) sowie Albuferon α (85.7 kDa). Der PEG-Rest ist an einer Stelle über eine stabile Amidbrücke mit einem Lysin des INF α -2a verbunden.

2.1.11. Potentielle Angriffspunkte und Hemmstoffe in der Hepatitis C Therapie

Grundsätzlich kann jeder einzelne Schritt im viralen Lebenszyklus als Angriffspunkt für die Entwicklung neuer antiviraler Verbindungen angesehen werden. Es ist nicht nur denkbar, sondern auch möglich von dem Eintritt des Virus bis hin zur Freisetzung reifer infektiöser Viren jeden einzelnen Schritt spezifisch zu hemmen. Die zurzeit gängige HCV Therapie bestehend aus der kombinierten Gabe von Ribavirin und pegyliertem INF α beziehungsweise

Albuferon, ist eine HCV-unspezifische Therapie, auf die zurückgegriffen werden muss, da bis zu dem jetzigen Zeitpunkt noch kein spezifischer Hemmstoff erfolgreich alle Phasen der klinischen Studien durchlaufen konnte.

Interferon stimuliert das adaptive und angeborene Immunsystem, Ribavirin wirkt auf vielfältige Weise wie beispielsweise durch Inhibition der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase, durch das Eingreifen in die Replikation der viralen Nukleinsäure und zusätzliche Stimulation des Immunsystems.⁸⁸ Der Fokus der aktuellen Therapie liegt darauf, die Wirtszelle in einen allgemeinen antiviralen Zustand zu bringen. Folglich gibt es ein großes Interesse an der Entwicklung von HCV spezifischen Hemmstoffen.

Dabei haben sich Inhibitoren der viralen Protease und Polymerase als äußerst vielversprechend erwiesen.⁸⁹⁻⁹¹ Im folgenden Abschnitt wird ein Resümee über Angriffspunkte, deren Inhibitoren und den aktuellen Stand der Forschung gegeben. Abschließend wird CD81 als innovatives Target in der Hepatitis C Therapie vorgestellt.

2.1.11.1. Protease-Inhibitoren

Das Nicht-Strukturprotein NS3, verantwortlich für die Prozessierung des Polyproteins, stellt ein mögliches antivirales Target dar. Mehrere Verbindungen z.B.: Telaprevir (VX-950, Vertex Pharmaceuticals), Boceprevir (SCH503034), BI2202 (Boehringer Ingelheim), MK-7009 (Merck), TMC435350 (Tibotec & Medivir) sowie ITMN-191 (InterMune & Roche) befinden sich bereits in der Vorklinik beziehungsweise in der klinischen Phase der Entwicklung (Abb. 5).⁹²⁻⁹⁴

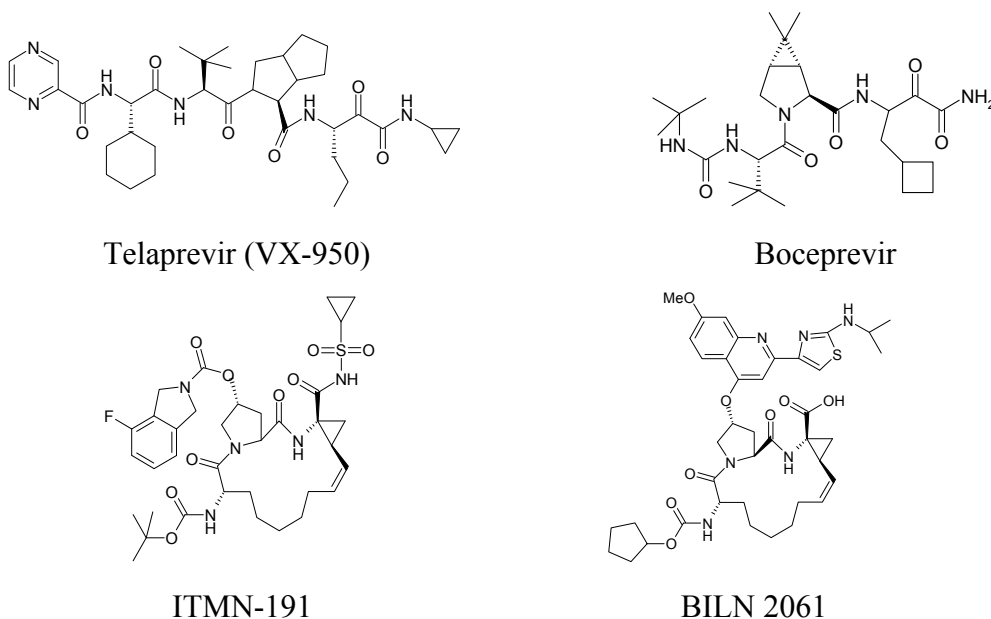


Abbildung 5: Darstellung der Strukturformeln der NS3-Proteaseinhibitoren Telaprevir, Boceprevir, ITMN-191 sowie BILN 2061.

Das proof of principle wurde mit der Verbindungsklasse BILN2061 (Boehringer Ingelheim) erbracht. Die weitere Entwicklung musste allerdings aufgrund schwerwiegender Nebenwirkungen eingestellt werden.⁹³ Weitere mögliche Targets sind unter anderem auch die NTP-Bindestelle von NS3 sowie die Bindestelle für Einzelstrang-RNA.⁹⁴

2.1.11.2. Polymerase-Inhibitoren

Das NS5B-Protein wirkt als RNA-abhängige RNA-Polymerase und synthetisiert somit die genomische Plusstrang-RNA. Gemäß ihrer Wirkungsweise unterscheidet man zwischen zwei Klassen an Polymerase-Inhibitoren. Auf der einen Seite gibt es nukleosidische Inhibitoren, die an der active site angreifen und einen Abbruch der Kettenverlängerung bewirken. Dazu zählen beispielsweise Valopicitabin (NM-283, Novartis Pharma), MK-0608 (Merck), R1626 (Roche), PSI-6130 und dessen Prodrug R7128 (Pharmasset). Auf der anderen Seite gibt es nicht nukleosidische Inhibitoren wie z.B. BILB 1941 (Boehringer Ingelheim) und HCV-796 (ViroPharm), die eine allosterische Inhibition bewirken (Abb. 6).⁹⁴ Auch wenn selbst in klinischen Studien äußerst vielversprechende antivirale Effekte gezeigt werden konnten, so musste die Weiterentwicklung aufgrund nachteiliger Nebenwirkungsprofile eingestellt werden.⁹⁵⁻⁹⁷

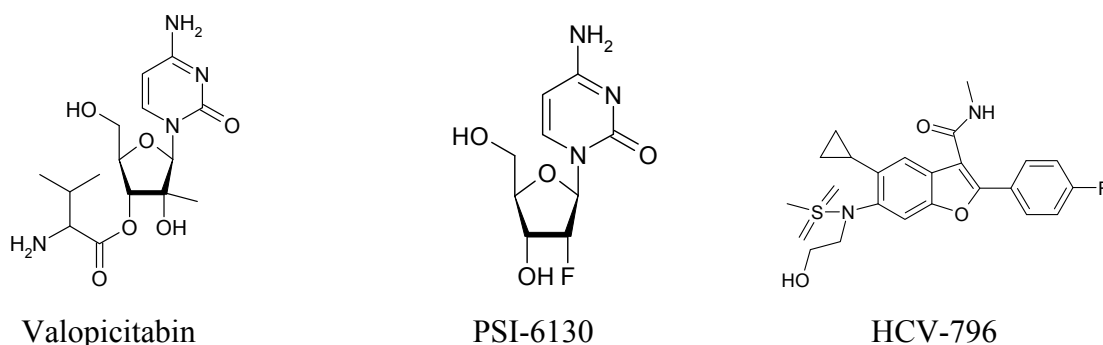


Abbildung 6: Darstellung der Strukturformeln der Polymerase-Inhibitoren Valopicitabin, PSI-6130 sowie HCV-796.

2.1.11.3. Immunmodulatoren

Ein weiteres innovatives Target ist die zelluläre Immunantwort, die durch sogenannte Immunmodulatoren verändert werden kann. Dabei handelt es sich um Agentien, die eine Immunantwort entweder neu generieren oder eine bestehende Antwort verstärken, indem sie in den Zytokinweg eingreifen. Zu dieser Klasse von Inhibitoren gehören Toll-like Rezeptor (TLR) Agonisten wie z.B. CPG 10101 (Actilon, Coley Pharmaceutical Group) und ANA 975 (Anadys Pharmaceuticals), deren antivirale Effizienz bereits in klinischen Studien nachgewiesen werden konnte.⁹⁸ Auch in diesem Fall musste eine Weiterentwicklung von

TLR7 und TLR9 Agonisten aufgrund eines nicht tragbaren Nebenwirkungsprofils eingestellt werden.

2.1.11.4. Weitere Targets

Die Effektivität von Cyclophilin B-Inhibitoren (z.B. NIM-811 (Novartis Pharma) und DEBIO-025 (Debiopharm S. A.) (Abb. 7), einem wirtszelleigenen Faktor, der eine entscheidende Rolle bei der viralen Replikation spielt, wird zurzeit in Patienten mit HCV untersucht^{99, 100}.

NS4A, der Cofaktor der NS3 Protease, wurde erst kürzlich als valides therapeutisches Ziel bei chronischer Hepatitis C nachgewiesen. Es gibt Agentien, die an NS4B binden können und somit die korrekte Prozessierung des Vorläuferproteins verhindern. Dabei wird die Bildung eines funktionsfähigen Replikationskomplexes gestört, was wiederum eine Störung der RNA-Synthese zur Folge hat. Des Weiteren werden bereits seit längerem Glukosidase-Inhibitoren entwickelt, allerdings mit mäßigem Fortschritt.

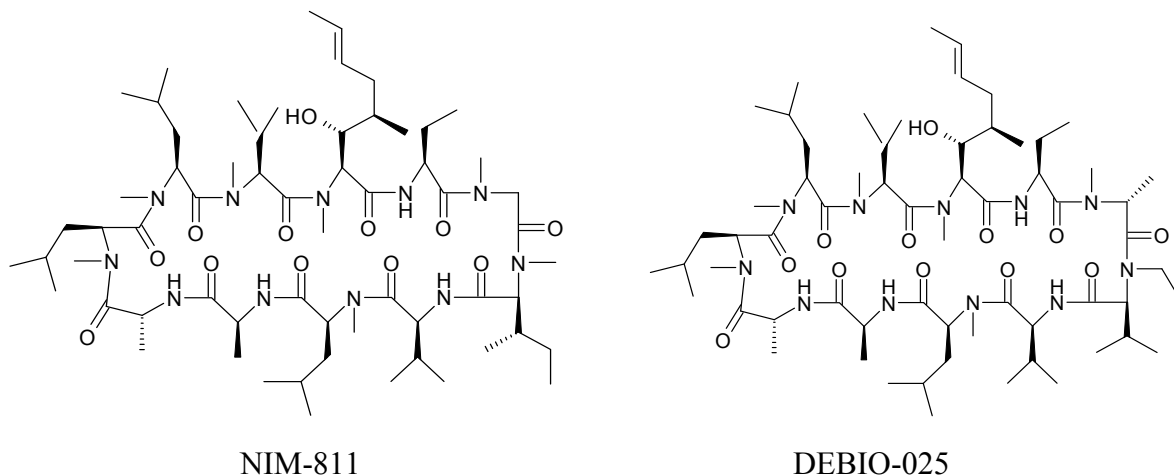


Abbildung 7: Darstellung der Strukturformeln der Cyclophilin B-Inhibitoren NIM-811 sowie DEBIO-025.

2.1.11.5. Fusionsinhibitoren

Bei der Entwicklung von Fusionsinhibitoren kann man prinzipiell zwei Ziele verfolgen. Entweder man greift an dem Virus selbst an oder an dem entsprechenden Rezeptor auf zellulärer Seite. Bis dato wurden noch keine wirksamen CD81 Inhibitoren veröffentlicht. Es wurden lediglich Strukturen vorgeschlagen, die CD81 imitieren und die virale Bindungsstelle an E2 blockieren.^{101, 102} Allerdings wurde die Wirkung dieser Peptidomimetika weder in Hepatitis C Pseudopartikeln (HCVpp) noch in HCVcc (Hepatitis C in Zellkultur) untersucht und bestätigt.

Einen neuen Ansatzpunkt stellt die Blockade des Tetraspanins CD81 dar, des zurzeit am besten charakterisierten Rezeptors für Hepatitis C Viren. CD81 stellt einen äußerst vielversprechenden Angriffspunkt für eine effiziente und HCV spezifische Therapie dar, da es im Menschen hochkonserviert vorliegt,¹⁰³ die dreidimensionale Struktur aufgrund des Vorhandenseins einer Röntgenkristallstruktur zugänglich ist¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ und eine Blockade *in vitro* zu einer vollständigen Blockade einer Infektion führt.^{9,76}

2.1.12. CD81-Rezeptor als potentiell Target

CD81 ist ein Tetraspanin das an einer Vielzahl biologischer Prozessen beteiligt ist. Dazu gehören die Adhäsion, Morphologie, Proliferation und Differenzierung der Zelle.¹⁰⁷ Wie alle Mitglieder der Tetraspanin-Superfamilie besteht es aus vier Transmembrandomänen, einer kleinen (SEL) und einer großen extrazellulären Schleife (LEL).¹⁰⁸ Die Bedeutung von CD81 bei dem Eintritt des Virus in die Wirtszelle wurde sowohl in HCVpp als auch in HCVcc bestätigt. Die Aminosäuren Leu162, Ile182, Asn184 und Phe186, die essentiell für die Interaktion mit dem Virus sind, befinden sich auf der LEL (Abb. 8).^{5,109,110}

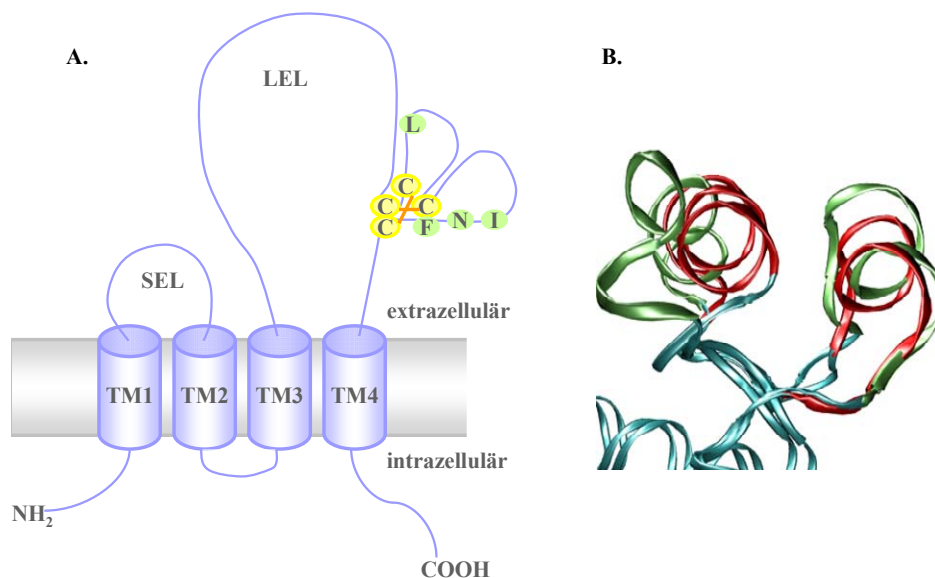


Abbildung 8: A. Schematische Darstellung der zweidimensionalen Struktur des Tetraspanins CD81 mit den vier Transmembrandomänen (TM1-4), der kleinen (SEL) und der großen extrazellulären Schleife (LEL) sowie dem intrazellulären N- und C-Terminus. Die beiden Disulfidbrücken der LEL sowie die daran beteiligten Cysteinreste sind gelb hervorgehoben. Die Aminosäuren, die an der Interaktion mit dem viralen E2 Protein beteiligt sind, sind blau unterlegt (Leu162, Ile182, Asn184, Phe186).¹⁰⁹ B. Röntgenkristallstruktur der D-Helix der LEL als Überlagerung der beiden Strukturen PDB ID: 1G8Q (grün) und 1IIV5 (rot).¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ Identische Abschnitte der Strukturen sind in türkis dargestellt.

Anhand der beiden Röntgenkristallstrukturen 1G8Q und 1IV5, die für die CD81-LEL erhältlich sind, wurden in unserem Arbeitskreis Moleküldynamikstudien durchgeführt, die die Schlussfolgerung zulassen, dass die LEL unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich in geschlossener Konformation vorliegt. Dennoch weisen C- und D-Helix der LEL einen gewissen Grad an Flexibilität auf. Diese ermöglicht eine Interaktion der zwischen den beiden Helices liegenden Furche mit kleinen Molekülen. Diese könnten die offene Konformation stabilisieren und eine Interaktion mit dem viralen E2 Protein verhindern.¹¹¹

2.1.13. Hemmung des CD81-vermittelten Hepatitis C Virus Zelleintritts

Enfuvirtide (Fuzeon, Roche) ist der erste Fusionsinhibitor, der in der Therapie von HIV erfolgreich eingesetzt wird (Abb. 9). Neben diesem Peptidomimetikum gibt es eine Reihe weiterer Fusionsinhibitoren, unter denen auch kleine organische Moleküle zu finden sind. Folglich ist es naheliegend, dass Moleküle existieren, die den Eintritt des Virus in die Wirtszelle unterbinden können, indem sie an CD81 binden und die Interaktionsstelle zwischen Virus und Rezeptor blockieren. Die Grundlage für die Entwicklung eines potenten Inhibitors ist das Vorhandensein eines entsprechend validen Testsystems, anhand dessen die Wirkung quantifiziert werden kann und das Vorhandensein einer Leitstruktur mit signifikanter Wirkung, die modifiziert und bezüglich ihrer Wirkung verbessert werden kann.

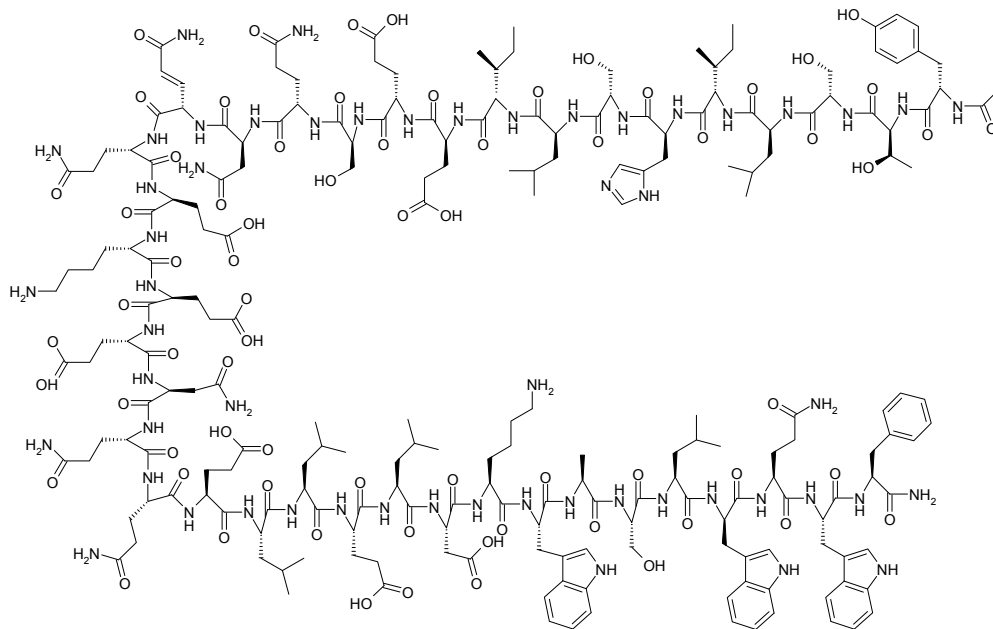


Abbildung 9: Darstellung der Strukturformel des Fusionsinhibitors Enfuvirtide, einem synthetischen, linearen Peptid aus 36 Aminosäuren (Primärsequenz: CH₃CO-Tyr-Thr-Ser-Leu-Ile-His-Ser-Leu-Ile-Glu-Glu-Ser-Gln-Asn-Gln-Gln-Glu-Lys-Asn-Glu-Gln-Glu-Leu-Leu-Glu-Leu-Asp-Lys-Trp-Ala-Ser-Leu-Trp-Asn-Trp-Phe-NH₂), welches am N-Terminus acetyliert und am C-Terminus als Carboxamid vorliegt.

2.1.13.1. Virtuelles Screening nach Inhibitoren der CD81-E2 Wechselwirkung

Die Röntgenkristallstrukturen der großen extrazellulären Schleife von CD81 weisen im Bereich der C- und D-Helix unterschiedliche Konformationen auf. Moleküldynamik Simulationen unseres Arbeitskreises haben gezeigt, dass beide Helices eine gewisse Flexibilität aufweisen, die es ermöglichen könnte, kleine inhibitorische Moleküle zu finden, die in diesen Spalt binden und eine Interaktion zwischen LEL und dem viralen E2 unterbinden.¹¹¹ Als Grundlage für das in unserem Arbeitskreis durchgeführte virtuelle Screening auf der Suche nach kleinen inhibitorischen Molekülen wurde eine 420.000 Verbindungen umfassende Substanzbibliothek verwendet, die sich aus der Maybridge- (Datenbank aus käuflich erwerblicher Verbindungen), ACD- (Available Chemicals Directory), NCI- (National Cancer Institute) Datenbank und der inhouse-Substanzbibliothek zusammensetzt. Aus diesen Substanzbibliotheken wurden reaktive Verbindungen und Verbindungen, die nicht den Lipinski *Rule-of-Five* entsprechen, aussortiert.¹¹² Die restlichen 100.000 Substanzen wurden mittels DOCK, GOLD und FlexX in die Röntgenkristallstrukturen gedockt. Diese Dockingstudie lieferte ein Set aus 200 virtuellen Treffern.

Zu den Dockingstudien wurde in unserem Arbeitskreis ein weiterer theoretischer Ansatz verfolgt, nämlich die Verwendung von niedermolekularen Deskriptoren zur Erstellung binärer QSAR-Modelle. Dabei wurde ein Entscheidungsbaum erstellt, der unter Berücksichtigung chemoinformatischer Deskriptoren zur Identifikation von Protein-Protein-Interaktionshemmstoffen genutzt wurde. Die verwendeten Deskriptoren bezogen sich dabei auf molekulare Eigenschaften wie räumliche Ausdehnung und Größe des Moleküls. Ebenso dienten sie dazu Verbindungen mit Esterfunktion auszuschließen, da diese als nicht drug-like angesehen wird.

Die anhand der virtuellen Studien erhaltenen Treffer sollten nun auf ihre biologische Relevanz weiterführend untersucht werden.

2.1.13.2. Biologisches Testsystem zur Quantifizierung der Hemmwirkung

Um die Effizienz der virtuellen Treffer zu überprüfen aber auch um *in vitro* weitere potentielle Inhibitoren des Viruseintritts zu finden, wird ein Testsystem benötigt, welches ermöglicht potentielle Hemmstoffe reproduzierbar und in hohem Durchsatz zu testen. Folglich wird an dieses Testsystem der Anspruch gestellt, dass es einfach, schnell und treffsicher Ergebnisse liefert und der Test in Anbetracht der Größe der zu testenden Substanzbibliotheken kostengünstig durchzuführen ist. Weiterhin sollte das Testsystem die

natürlichen Gegebenheiten einer Infektion mit Hepatitis C Viren so genau wie möglich widerspiegeln, ohne jedoch zu komplex in der Durchführung zu werden.

Im Gegensatz zu der klassischen, meist intuitiven und auf Erfahrung beruhenden Arzneistoffentwicklung stützt diese sich heute auf systematische Methoden. Von großer Bedeutung für das Finden von Treffern mit einer gewissen Aktivität am gewünschten Target sind Testsysteme, anhand derer im Hochdurchsatzverfahren große Substanzbibliotheken verschiedenster Substanzklassen untersucht werden können. Das Ziel eines solchen Testverfahrens liegt darin, die Fülle an Substanzen auf ein Minimum zu beschränken ohne dabei aktive Substanzen zu eliminieren, so dass die Generierung einer Leitstruktur möglich ist. Diese kann dann im Rahmen weiterer pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Untersuchungen optimiert werden.

2.2. Acetylcholinesterase (E.C.3.1.1.7)

Die Suche nach neuen Wirkstoffen orientiert sich an sogenannten Leitstrukturen. Dabei handelt es sich um Liganden, die an einer Zielstruktur noch nicht optimale Bindungsaffinität aufweisen.

Im Rahmen der Entwicklung einer Leitstruktur muss diese bezüglich verschiedener Faktoren optimiert werden. Zu den Hauptfaktoren der Optimierung zählen die Wirkstärke am gewünschten Ziel, die Selektivität gegenüber nahe verwandten oder ähnlichen Zielen und die Wirkdauer. Nebenwirkungen und toxische Effekte werden auf ein Minimum reduziert, so dass die Leitverbindung als drug-like eingestuft werden kann. Als drug-like bezeichnet man Verbindungen deren funktionelle Gruppen und physikalische Eigenschaften mit der Mehrheit der bekannten Arzneistoffe übereinstimmen.

Wenn diese grundlegenden Faktoren gewährleistet sind d.h. eine Verbindung vorliegt, die in geringer Konzentration eine starke Wirkung zeigt und gleichzeitig einen hohen Selektivitätsfaktor aufweist, folgen zusätzliche Untersuchungen, die mögliche off target-Wirkungen und somit unerwünschte Nebenwirkungen des Hemmstoffes aufdecken. Hierbei wird der Schwerpunkt auf Enzyme und Rezeptoren gelegt, von denen bekannt ist, dass eine ungewünschte Wechselwirkung zu schwerwiegenden Nebenwirkungen führt, die im Rahmen der Hemmstoffentwicklung ausgeschlossen werden müssen.

In diesem Zusammenhang wird beispielsweise die Interaktion mit hepatischen Cytochrom-P450 Enzymen, die als mikrosomale, mischfunktionelle Oxygenasen eine entscheidende Rolle bei der Biotransformation von Arzneistoffen spielen, untersucht. Hepatische CYP-Enzyme sind die wichtigsten Katalysatoren des oxidativen Metabolismus von Xenobiotika sowie die Hauptenzyme der Phase I Reaktion der Biotransformation. Eine Inhibition dieser Enzyme bei gleichzeitiger Gabe weiterer Hemmstoffe führt zu einer nachteiligen Interaktion zwischen den entsprechenden Hemmstoffen und sollte folglich vermieden werden.

Ebenso sollte untersucht werden, ob Wechselwirkungen mit dem P-Glykoprotein auftreten. Dabei handelt es sich um ein sogenanntes ABC-Protein, welches unter ATP-Verbrauch körperfremde Substanzen aktiv aus der Zelle transportiert und in den Blutkreislauf befördert und somit die Zugänglichkeit von Medikamente zu ihrem Wirkort beschränkt.

Aber auch Enzyme wie beispielsweise die Acetylcholinesterase, die den Neurotransmitter Acetylcholin an der postsynaptischen Membran spaltet und somit die Reizweiterleitung beendet, müssen in diese Untersuchungen einbezogen werden. Eine Hemmung dieses Enzyms kann im schlimmsten Fall zum Tod durch Herzstillstand führen.

2.2.1. Klassifizierung der Acetylcholinesterase

Die Acetylcholinesterase (E.C.3.1.1.7) trägt laut Nomenklaturkomitee der Internationalen Union für Biochemie und Molekularbiologie (NC-IUBMB) den Namen Acetylcholin-Hydrolase, wird aber auch als E-Typ oder Erythrozyten-Cholinesterase bezeichnet.

Die 1914 von Dale entdeckte Enzym Acetylcholinesterase,¹¹³ deren Spezifität für Acetylcholin von Nachmansohn et al. nachgewiesen wurde,¹¹⁴ ist eine Hydrolase, genauer gesagt eine Esterase, die die Umsetzung des Neurotransmitters Acetylcholin zu Acetat und Cholin katalysiert. Die Acetylcholinesterase zeichnet sich durch eine ausgeprägte Substratspezifität für Acetyl- β -methylcholin, Acetylthiocholin und Acetylcholin aus.

2.2.2. Vorkommen und biologische Funktion der Acetylcholinesterase

Das Enzym Acetylcholinesterase kommt überwiegend im zentralen Nervensystem (ZNS), an den neuromuskulären Synapsen sowie in dem vegetativen Nervensystem vor. Hier inaktiviert sie den Neurotransmitter Acetylcholin an chemischen Synapsen (Abb. 10) und verhindert somit eine Dauerreizung, die sich durch Sehstörungen, Atemnot, Muskelzuckungen, Krämpfen, Atemlähmung und schließlich den Eintritt des Todes äußern würde.

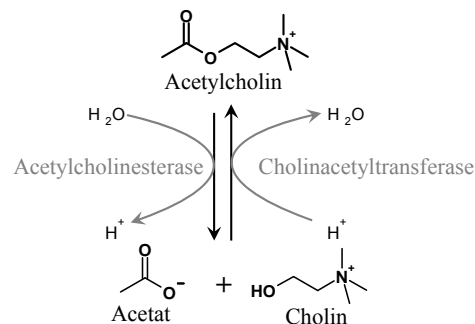


Abbildung 10: Abbau und Synthese des Neurotransmitters Acetylcholin katalysiert von den Enzymen Acetylcholinesterase und Cholinacetyltransferase

2.2.3. Bedeutung der Acetylcholinesterase bei der Weiterleitung eines Aktionspotenzials

Erreicht ein Aktionspotenzial einen Axonendkopf, so kommt es zu einer Öffnung der Natriumkanäle und dadurch zu einer Depolarisation der Membran. Diese wiederum führt zu einer Öffnung spannungsgesteuerter Ca²⁺-Kanäle und dadurch zu einem Einstrom zweiwertiger Kalziumionen in das Axonende. Diese Ionen bewirken, dass synaptische Bläschen, die mit Acetylcholin gefüllt sind, zur präsynaptischen Membran diffundieren, dort mit der Membran verschmelzen und Acetylcholin in den synaptischen Spalt freisetzen. Hier diffundiert Acetylcholin zu seinem Rezeptor an der postsynaptischen Membran. Es kommt zu

einem Einstrom von Na^+ -Ionen und zu einer Depolarisation der Membran. Dadurch wird die nachfolgende Zelle erregt und das elektrische Signal auf sie übertragen (Abb. 11).

Acetylcholin sorgt im synaptischen Spalt für eine schnelle Hydrolyse und somit Inaktivierung des Neurotransmitters Acetylcholin. Die Reaktionsprodukte Acetat und Cholin werden wieder in die präsynaptische Zelle aufgenommen. Dort wird der Neurotransmitter durch Cholinacetyltransferase erneut synthetisiert und steht in seiner aktiven Form dem nächsten eintreffenden Aktionspotenzial zur Verfügung.

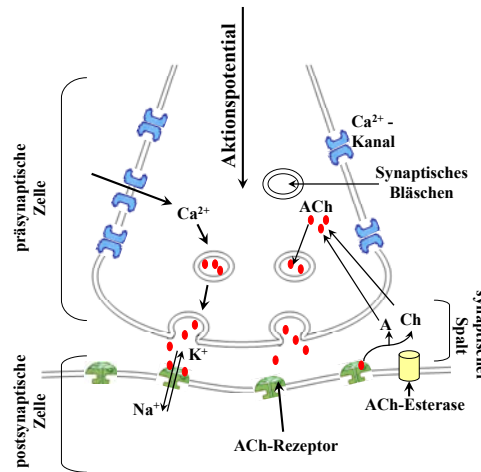


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Signalweiterleitung an einer cholinergen Synapse nach Eintreffen eines Aktionspotenzials. (ACh: Acetylcholin; A: Acetat; Ch: Cholin)

2.2.4. Katalytischer Mechanismus der Acetylcholinesterase

Die Acetylcholinesterase weist zwei Areale auf, die für die Spaltung des Substrates von Bedeutung sind. Zum einen besitzt sie einen anionischen Bereich auch Cholinbindetasche genannt, die ein elektronenreiches Tryptophan (Trp_{84}) enthält und über elektrostatische Anziehungskräfte mit dem Stickstoffatom des Acetylcholins wechselwirken kann, zum anderen eine sogenannte Esterbindungsstelle (Abb. 12).

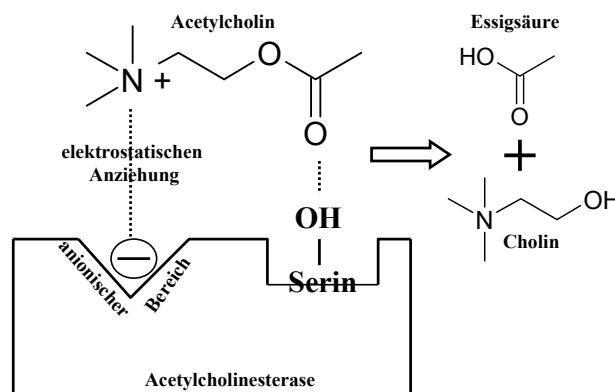
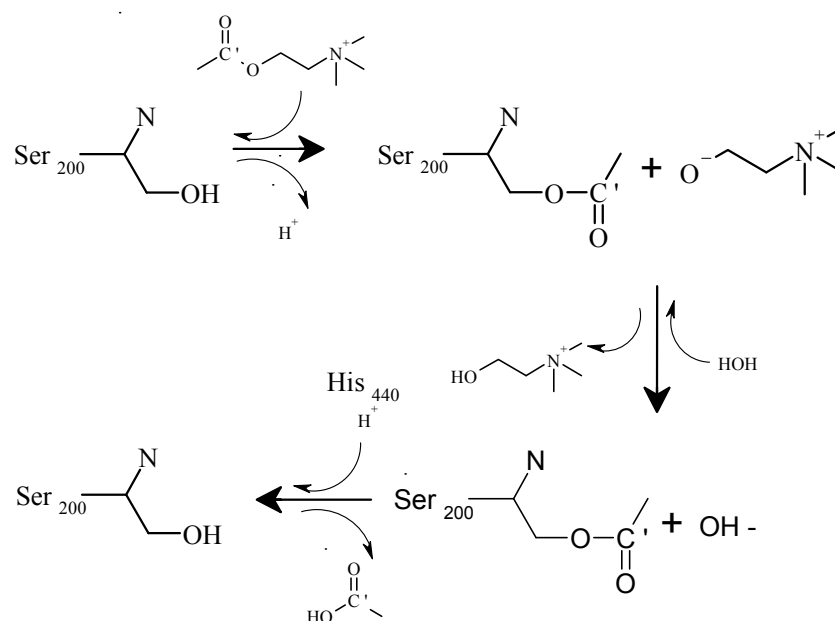


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Spaltung und somit Inaktivierung von Acetylcholin durch Acetylcholinesterase und den für die Spaltung wichtigen Arealen.

Der katalytische Mechanismus der Acetylcholinesterase lässt sich wie folgt darstellen. Gelangt das Substrat in die Nähe der katalytischen Triade aus Ser₂₀₀, Glu₃₂₇ und His₄₄₀, so stabilisiert das Glu₃₂₇ den Ring des His₄₄₀ in der Art, dass das His₄₄₀ das Proton der OH-Gruppe des Ser₂₀₀ übernehmen kann. Das aktive Ser₂₀₀ führt einen nukleophilen Angriff am Carbonyl-Kohlenstoff des Substrates durch. Dadurch entsteht ein tetraedrisches Intermediat. Die negative Partiaalladung des Carbonyl-Sauerstoffs wird durch Ausbildung zweier Wasserstoffbrücken stabilisiert. Cholin wird abgespalten und es entsteht ein Acyl-Enzym-Komplex. Schließlich wird ein Wassermolekül an den Acyl-Enzym-Komplex gebunden, wobei ein zweites tetraedrisches Intermediat entsteht. Dieses zerfällt in Enzym und Acetat und schließt den Katalyseprozess ab (Abb. 13).



115

Abbildung 13: Vereinfachter Reaktionsmechanismus der enzymatischen Spaltung von Acetylcholin durch das Enzym Acetylcholinesterase.

2.2.5. AchE-Hemmer als Therapeutika

Die Acetylcholinesterase nimmt eine Schlüsselfunktion bei verschiedenen Krankheiten ein, wie z.B. dem Glaukom, einer Erkrankung des Sehnervs, die durch den Verlust von Nervenfasern zur Erblindung führen kann,¹¹⁶ der Myasthenia gravis, einer belastungsabhängigen Muskelschwäche, bedingt durch eine gestörte Signalübertragung zwischen Nerv und Muskel¹¹⁷ und der Alzheimer Erkrankung, einer neurodegenerativen Erkrankung überwiegend älterer Menschen.^{118, 119}

Dabei reguliert die Gabe eines AchE-Hemmstoffes im Falle des Glaukoms den Augeninnendruck durch Kontraktion des Musculus sphincter pupillae und den dadurch erreichten verbesserten Kammerwasserabfluss. Bei dem Krankheitsbild Myasthenia gravis,

einer Autoimmunerkrankung, verdrängen AchE-Hemmer durch den erzeugten Überschuss an Acetylcholin die Antikörper von dem Rezeptor und ermöglichen somit eine erneute Reizweiterleitung. In der Alzheimer Therapie gleichen Hemmstoffe der Acetylcholinesterase die Reduktion der Aktivität cholinergere Neuronen durch die Ansammlung von Acetylcholin im synaptischen Spalt aus.

2.2.6. Hemmstoffe der Acetylcholinesterase

Da die Acetylcholinesterase eine Schlüsselrolle in der neuronalen Reizweiterleitung spielt, stellt sie ein Ziel für natürliche cholinerge Toxine dar. Dazu zählen beispielsweise die pflanzlichen Glykoalkaloide aber auch synthetische cholinerge Toxine wie Carbamate und Organophosphate, die Einsatz als Insektizide bzw. Nervengase finden.

Eine kontrollierte Anwendung von AchE-Hemmern im medizinischen Bereich kann aber auch erfolgreich Einsatz finden. Die wichtigsten Klassen der Acetylcholinesteraseinhibitoren sind Acridine (z.B. 1,2,3,4-Tetrahydroaminoacridin), Carbamate (z. B. Rivastigmin), N-Benzylpiperidine (z.B. Donepezil) sowie Naturstoffe (z.B. Huperzin A) und deren synthetische Derivate.

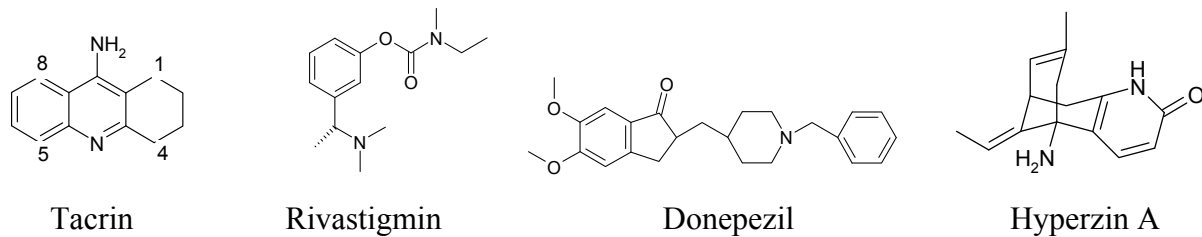


Abbildung 14: Darstellung der Strukturformel von Tacrin, Rivastigmin, Donepezil, Hyperzin A, den bekanntesten Vertretern der wichtigsten Klassen an Acetylcholinesteraseinhibitoren

2.3. 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ I (17 β -HSD1)

Bevor eine Substanz, die erfolgreich die frühe präklinische Phase durchlaufen hat, in die klinische Phase übergeführt werden kann und somit zur Testung am Menschen freigegeben wird, muss ein sogenanntes Proof of Concept erbracht werden. Dies ist der Beweis dafür, dass die Verbindung *in vitro* den gewünschten Effekt zeigt. Dafür muss zunächst eine geeignete Spezies gefunden werden, anhand derer eine *in vivo* Wirkung gezeigt werden kann. Ebenso muss ein pharmakodynamisches sowie pharmakokinetisches Profil (ADME: Absorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion) erstellt und auf Toxizitätseffekte getestet werden.

Endometriose und Brustkrebs stellen zwei der am weitesten verbreiteten estrogenabhängigen Erkrankungen weltweit dar. Für eine effiziente Therapie stehen mehrere Optionen zur Verfügung, wobei grundsätzlich eine Reduktion des Levels an wachstumsstimulierendem Estrogen angestrebt wird. Um eine Minimierung der Nebenwirkungen zu gewährleisten wäre es sinnvoll den letzten Schritt der Estrogenbiosynthese durch Hemmung der 17 β -HSD1 zu unterbrechen und somit die Umsetzung des schwach potenten Estrogens Estron zu dem hochwirksamen Estradiol zu verhindern.

2.3.1. Steroidhormone

Steroidhormone sind biochemische Botenstoffe, die innerhalb eines Lebewesens Informationen übermitteln. Ihre Funktion kann unterteilt werden in Regulation der Fortpflanzung und der sexuellen Differenzierung, Entwicklung und Wachstum, Regulierung des Metabolismus und des Stoffwechsels. Die Biosynthese steroidaler Sexualhormone findet in männlichen Organismen in den Testes, bei weiblichen in der prämenopausalen Phase in den Eierstöcken statt. Einzelne Syntheseschritte können aber auch in dem Gehirn und beispielsweise in dem Fettgewebe stattfinden.^{120, 121}

Steroidhormone werden auch mit der Entstehung und dem Fortschreiten verschiedener Erkrankungen in Verbindung gebracht. Zu den estrogenabhängigen Erkrankungen zählen dabei Brustkrebs und Endometriose, zu den androgenabhängigen Erkrankungen werden Benigne Prostata-Hyperplasie und das Prostatakarzimon gezählt. Eines der wirkungsstärksten Enzyme, das im Kontext estrogenabhängiger Erkrankungen diskutiert wird, ist die 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1.

2.3.2. Klassifizierung der 17 β -HSD1

Die Ende der 50er Jahre des 20ten Jahrhunderts von Engel et al.¹²² beschriebene 17 β -HSD1 (EC 1.1.1.62) gehört laut EC-Klassifikation zu der Gruppe der Oxidoreduktasen, genauer

gesagt zu den Hydroxysteroid-Dehydrogenasen. Innerhalb dieser Enzymgruppe sind die 17 β -HSDs eine Gruppe von Enzymen, die an der 17 β -Position des Steroides die entsprechende Reaktion katalysieren.

2.3.3. Vorkommen und biologische Funktion der 17 β -HSD1

Die 17 β -HSD1 wird in Plazenta, Eierstöcken, Endometriumgewebe, der Prostata aber auch in peripherem Gewebe exprimiert. Es handelt sich dabei um ein zytosolisches Protein von dem mehrere Röntgenkristallstrukturen existieren.¹²³ Die 17 β -HSD1 liegt als Homodimer vor.¹²⁴ Die Untereinheiten sind jeweils 34.9 kDa groß und setzen sich aus 327 Aminosäuren zusammen.¹²⁵ Die charakteristischen Untereinheiten des Enzyms sind seine Substratbindungsstelle, die durch einen überwiegend hydrophoben Tunnel dargestellt wird, eine Kofaktorbindungsstelle, die wie bei allen Enzymen dieser Familie durch die Rossmann fold, einer aus α - Helices und β -Faltblättern gebildete Region mit charakteristischer Aminosäuresequenz, gebildet wird,¹²⁶ sowie ein entry loop, der in verschiedenen Konformationen auftreten kann und damit entweder Kofaktor- oder Substratbindungsstelle blockieren kann.

Das Enzym katalysiert hauptsächlich die Konversion von Estron zu Estradiol, wobei NADPH¹²⁷ (*in vitro* auch NADH) als Kofaktor dient (Abb. 15). Es kann aber auch in einem wesentlich geringeren Maß Dehydroepiandrosteron (DHEA) zu 5-Androsten-3 β , 17 β -diol umsetzen.

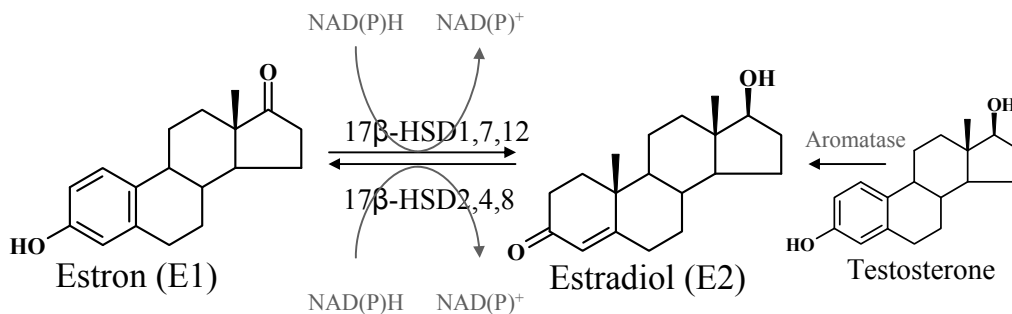


Abbildung 15: Schematische Darstellung der *in vivo* Bildung von 17 β -Estradiol unter Angabe der an der Umsetzung beteiligten Enzyme sowie der Edukte.

2.3.4. Postulierter katalytischer Mechanismus

Bei der Übertragung des Hydrids auf das Steroid spielen vier Aminosäuren eine essentielle Rolle. Die katalytische Tetrade, zusammengesetzt aus den Aminosäuren Tyr₁₅₅, Lys₁₅₉, Ser₁₄₂ sowie Asn₁₁₄, stabilisiert dabei das Steroid und die Ribose des Nikotinamides.¹²⁸⁻¹³⁰ Dabei wird das Hydrid des Kofaktors auf C17 des Steroids übertragen, wobei der Ketosauerstoff an der Position C17 eine starke Wasserstoffbrücke mit der Hydroxygruppe des Tyr₁₅₅ eingeht.

Der Protonentransfer wird durch die protonierte Seitenkette des Lys₁₅₉, die 2'-OH Gruppe der Ribose und auch durch Asn₁₁₄ erleichtert (Abb. 16).^{131, 132}

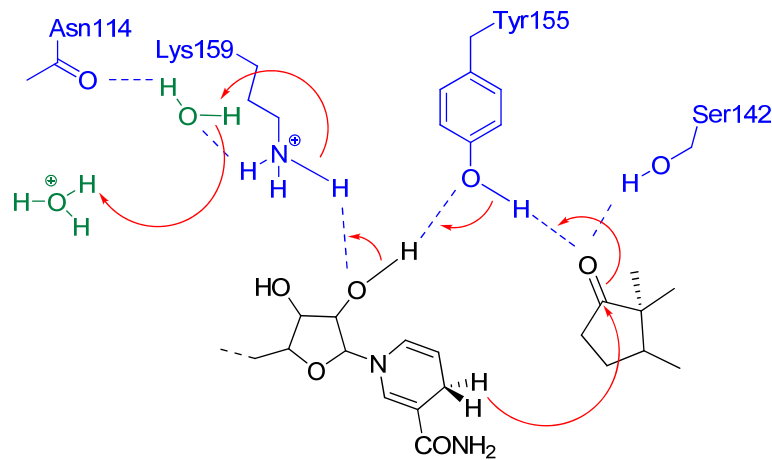


Abbildung 16: Postulierter Mechanismus für die Umsetzung von Estron durch 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ1. Die katalytische Tetrade Asn₁₁₄, Tyr₁₅₅, Lys₁₅₉ und Ser₁₄₂ sind blau dargestellt. Das Substrat Estron sowie der Kofaktor NADPH sind schwarz dargestellt.^{133, 134}

2.3.5. Endometriose

Das bereits 1860 von Karl von Rokitansky¹³⁵ beschriebene Krankheitsbild Endometriose ist eine gutartige, nicht metastasierende Erkrankung und einer der häufigsten gynäkologischen Befunde, der 0.5 bis zu 5 % der Frauen im reproduktiven Alter und sogar bis zu 40 % aller unfruchtbaren Frauen betrifft.¹³⁶ Es handelt sich dabei um eine chronische, häufig rezidivierende Erkrankung, bei der endometriales Gewebe ektop wächst. Sie wird durch Unterleibsschmerzen, Dysmenorrhoe, Dyspareunie und psychischer Belastung geprägt.¹³⁷ Endometriumherde treten bevorzugt am Peritoneum auf, können allerdings auch außerhalb des Bauchraumes auftreten. Sie reagieren auf die zyklischen Veränderungen im Körper einer Frau ähnlich dem normalen Endometrium. Jedoch kann die gebildete Schleimhaut nicht abgestoßen werden, so dass innere Blutansammlungen entstehen, die im Zusammenspiel mit der Zersetzung des Blutes und des Endometriosegewebes zu Entzündungen und Schmerzen führen.

2.3.5.1. Pathogenese

Bis zu dem heutigen Zeitpunkt werden verschiedene Ansätze, anhand derer die Entstehung von Endometriose erklärt werden kann, diskutiert. Allerdings ist keine alleine ausreichend, um alle Prozesse zu erklären, die mit dieser Erkrankung einhergehen.

Die von Sampson entwickelte Theorie der retrograden Menstruation geht davon aus, dass endometriale Zellen retrograd in den Bauchraum einwandern und sich dort festsetzen.¹³⁸ Daneben existiert die sogenannte Metaplasietheorie nach der pluripotentes Epithel auch bei Erwachsenen ausdifferenzieren und Endometriumherde bilden kann.^{139, 140} Neben diesen präferierten Theorien gibt es noch die sogenannte Induktionstheorie,¹⁴¹ die Theorie der Metastasierung über die Lymph- und Blutgefäße¹⁴² und eine Kombinationstheorie.¹⁴³

2.3.5.2. Therapie

Aufgrund der mangelnden Kenntnis über die genaue Ursache der Endometriose beschränkt sich die zurzeit gängige Therapie fast ausschließlich auf die Behandlung der Symptome und damit auf die Erhöhung der Lebensqualität der Betroffenen durch Stabilisierung des Befundes und Vermeidung von Rezidiven. Sie umfasst die chirurgische Entfernung des betreffenden Gewebes, die Hemmung des estrogenabhängigen Wachstums der Endometrioseherde sowie die Schmerzbekämpfung. Eine dauerhafte Heilung der Endometriose hingegen ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht möglich.

2.3.5.2.1. Hormontherapie

In der hormonellen Therapie der Endometriose finden verschiedene Steroidhormonderivate und GnRH-Analoga Einsatz. Dazu gehören das von Testosteron abgeleitete Danazol, Gestagene sowie GnRH-Agonisten. Es wird darauf abgezielt die ovarielle Steroidbiogenese und somit die Sekretion von Estradiol zu minimieren und damit die Zellproliferation im Endometrium zu reduzieren.

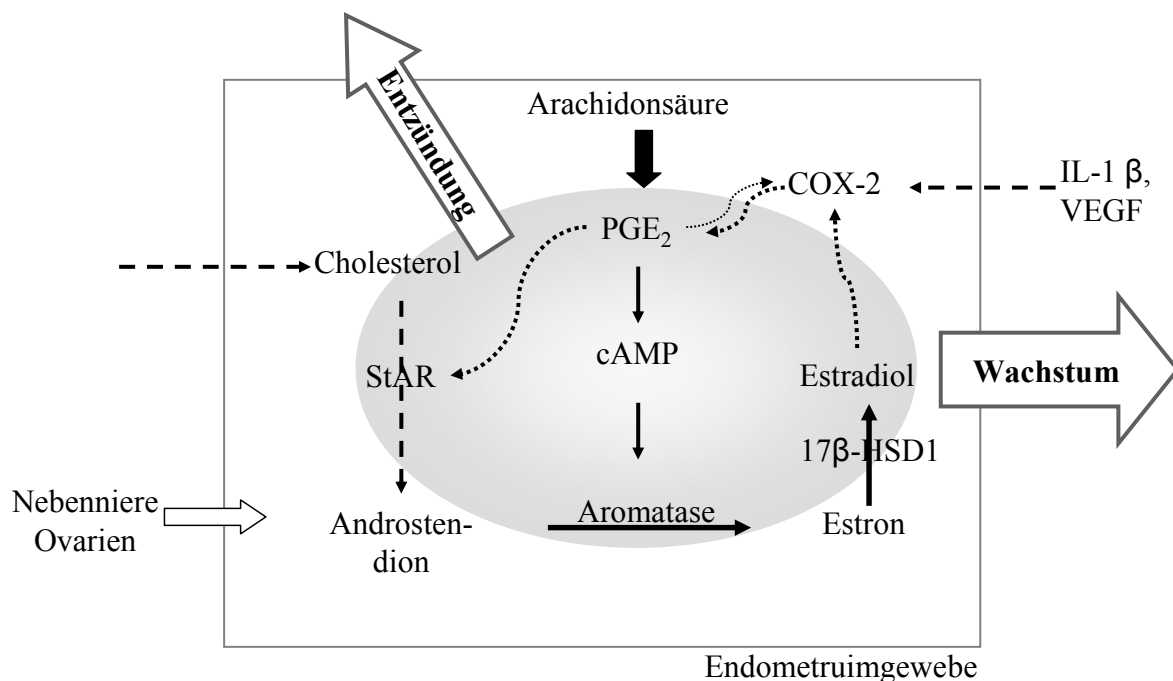
2.3.5.2.2. Schmerztherapie

Als Mittel der Wahl bei der Endometriose-assoziierten Schmerztherapie werden nichtsteroidale antiinflammatorische Mittel (NSAID: non steroidal anti inflammatory drugs) angewandt. In erster Linie werden Paracetamol oder Aspirin verwendet. NSAIDs minimieren durch die Inhibition der Prostaglandinsynthese nicht nur den Schmerz sondern auch Entzündungsprozesse, da sie die im Endometrium in erhöhter Konzentration vorkommende Cyclooxygenase-2 blockieren.^{144, 145} Von der Langzeitanwendung ist jedoch aufgrund gastrointestinaler Nebenwirkungen abzuraten.¹⁴⁶

2.3.5.3. Endometriose und 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase

Genauere Untersuchungen der Konversion von Estron zu Estradiol sowie der daran beteiligten Enzyme im Endometriosegewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe zeigen, dass 17 β -

Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ I in diesem Gewebe überexprimiert vorliegt, wohingegen 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ II in verminderter Menge auftritt. Dies hat zur Folge, dass es zu einer Erhöhung des Levels an Estradiol kommt, welches einen starken Einfluss auf die Proliferation des betroffenen Gewebes hat. Eine Verstärkung dieses Effektes wird zusätzlich durch ein vermehrtes Auftreten von Aromatase in diesem Gewebe bewirkt. Diese wiederum wandelt Androstendion zu Estron um, welches durch die überexprimierte 17 β -HSD1 erneut zu Estradiol umgewandelt wird. Attar et al. beschreiben einen positiven feedback Mechanismus, der im Endometrium zu einer permanenten Estradiolbildung und damit zu einer Stimulation des Wachstums führt und dabei gleichzeitig zu einer Verstärkung der Entzündungsprozesse in dem Gewebe.¹⁴⁷



147

Abbildung 17: Entzündungsprozesse und abnormale Proliferation als Kennzeichen der Endometriose werden durch PGE₂ (Prostaglandin E₂) sowie Estradiol vermittelt und sind Teil eines positiven Rückkopplungsmechanismus, bei dem eine Überexpression der Aromatase und der 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ I (17 β -HSD1) zu einem Anstieg des intrazellulären Estradiollevels und zu einem gesteigerten Wachstum führt. Ebenso induziert Estradiol die Cyclooxygenase Typ 2 (COX-2) und bewirkt somit einen Anstieg an Prostaglandin E₂ (PGE₂), was wiederum zu Schwellungen, Rötungen und zu Schmerzen führt. PGE₂ wiederum hat einen stark stimulatorischen Effekt auf StAR (steroidogenic acute regulatory protein) und Aromatase. Somit entsteht ein sich selbst verstärkender Kreislauf aus Wachstum bei gleichzeitiger Entzündung des Gewebes.

2.3.6. Brustkrebs

Brustkrebs oder auch Mammakarzinom bezeichnet stellt die am weitesten verbreitete hormonabhängige Erkrankung bei Frauen dar. Dabei handelt es sich um eine asymptomatische Erkrankung, die nur durch gründliche Beobachtung und regelmäßige Untersuchung des Brustgewebes und zusätzliche Ultraschalluntersuchungen bzw. Mammographie erkannt werden kann.

Man unterscheidet prinzipiell zwischen hormonunabhängigen und hormonabhängigen Tumoren sowie zwischen Estrogenrezeptor positiven (ER+) und negativen (ER-) Tumoren. Dieser Unterscheidung stellt auch die Grundlage für die Therapie von Brustkrebs dar.

2.3.7.1. Pathogenese

Jede neunte Frau wird im Laufe ihres Lebens Brustkrebs entwickeln. Dabei verdoppelt sich die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung alle zehn Jahre bis zum Eintritt der Menopause. Die Ursachen für Brustkrebs sind komplexer Natur und äußerst vielfältiger Art.

Diskutiert werden dabei UV-Strahlung, Asbest, Rauchen aber auch die genetische Prädisposition, die auf Mutationen bestimmter Gene zurückzuführen ist.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ Als Risikofaktoren gelten auch fortgeschrittenes Alter, später Eintritt der Menopause, eine späte Schwangerschaft ebenso wie das Auftreten benignen Formen von Brustkrankungen.

2.3.7.2. Therapie

In der Therapie von Brustkrebs setzt man zunächst auf die chirurgische Entfernung des betroffenen Gewebes oder des entsprechenden Organes in Kombination mit einer in mehreren Zyklen durchgeführten Chemotherapie, bei der die Gabe von Zytostatika die Abtötung der noch verbliebenen Tumorzellen bewirken soll. Nach der operativen in den meisten Fällen brusterhaltenden Entfernung des Tumorgewebes schließt sich in den meisten Fällen eine Strahlentherapie an, bei der Tumorzellen aufgrund der im Vergleich zu dem umliegenden Gewebe höheren Teilungsrate abgetötet werden sollen. Die Strahlentherapie hat zwar statistisch gesehen keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben, senkt allerdings die Rate an Rezidiven signifikant.¹⁵¹⁻¹⁵³

Auch wenn in der Therapie von Brustkrebs etliche erfolgreiche Methoden zur Verfügung stehen, stellt diese Erkrankung mit 548.000 Toten pro Jahr immer noch eine große Herausforderung dar.¹⁵⁴

2.3.7.3. Brustkrebs und 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass das Enzym 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ I in Brustkrebsgewebe ähnlich der Endometriose im Vergleich zu gesundem Gewebe überexprimiert wird. Aufgrund dessen kommt es zu einer verstärkten Bildung von Estradiol und somit zu einer Stimulation des Wachstums dieser Zellen. Im Gegensatz dazu liegt die 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ II lediglich in nicht nachweisbaren Mengen vor, so dass es zu einer zusätzlichen Akkumulation des wachstumsfördernden Estradiol in den wuchernden Zellen kommt.¹⁵⁵⁻¹⁵⁹ Ausgehend von dieser Erkenntnis stellen selektive Inhibitoren der 17 β -HSD1 ein äußerst vielversprechendes Target in der Behandlung von Brustkrebs aber auch Endometriose dar.

3. Zielsetzung der vorliegenden Dissertation

In der Therapie von HCV werden lediglich HCV unspezifische Hemmstoffe eingesetzt, die zudem ein schlechtes Nebenwirkungsprofil aufweisen. Die Entwicklung vieler spezifischer Hemmstoffe musste aufgrund gravierender Nebenwirkungen eingestellt werden und die Entwicklung eines Impfstoffes scheint ein unüberwindbares Hindernis darzustellen. Dies alles sind Gründe dafür, dass ein hoher Bedarf an wirksamen und Hepatitis C spezifischen Hemmstoffen besteht.

Unsere Arbeitsgruppe hat sich dabei auf CD81-LEL als innovatives Ziel fokussiert, da das Tetraspanin CD81, im Gegensatz zu dem Virus selbst, keinen Mutationen unterliegt und stark konserviert vorliegt. Ein weiterer Vorteil von CD81 als Zielstruktur ist das Vorliegen von Röntgenkristallstrukturen der LEL. Diese erlauben einen virtuellen Ansatz zur Hemmstoffsuche. Außerdem ist bekannt, dass der Antikörper JS81 eine Infektion mit HCVpp und auch HCVcc verhindern kann. Folglich kann eine Infektion der Wirtszellen anhand dieses Antikörpers simuliert werden.

Ziel der Arbeit war es einen Test zu entwickeln, anhand dessen umfangreiche Substanzdatenbanken mit hohem Durchsatz einfach und kostengünstig nach potentiellen Hemmstoffen der Virus-Wirtszelle-Interaktion durchsucht werden können. Dafür musste zunächst ein geeigneter Test entwickelt und die einzelnen Parameter des Tests moduliert und eingestellt werden. Schließlich sollte die Aussagekraft des Tests anhand eines Infektionstests mit viralen HCV Partikeln überprüft und die gefundenen Treffer anhand virtueller Methoden weiter untersucht werden. Die gefundenen Treffer, Substanzen die eine gewisse Aktivität bezüglich der Hemmung der Interaktion zwischen CD81 und dem durch den Antikörper JS81 simulierten viralen E2 Protein haben, sollten im weiteren Entwicklungsprozess zu einer Leitverbindung führen. Diese sollte durch hohe Aktivität sowie Selektivität gekennzeichnet sein.

Im Rahmen der Entwicklung von Wirkstoffen sowie deren Optimierung zum Arzneistoff müssen verschiedene Hürden bewältigt werden. Nach der Identifizierung eines geeigneten Targets und dessen Validierung, müssen zunächst Verbindungen gefunden werden, die eine gewisse, wenn auch vorerst geringe Aktivität aufweisen. Aus diesen wird eine Leitverbindung abgeleitet, die in weiteren Optimierungsschritten zu hochaktiven und selektiven Verbindungen modifiziert wird. In der späten Phase der noch vorklinischen Entwicklung müssen diese Verbindungen zudem weiteren Untersuchungen unterzogen werden. Dabei richtet sich das Augenmerk neben der bereits nachgewiesenen hohen Aktivität und

Selektivität auf weitere Parameter wie beispielsweise die Hemmung hepatischer CYP-Enzyme, Hemmung des HERG-Kanals aber auch Hemmung der Acetylcholinesterase.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Verbindungen, die sich bereits in einer späten Phase der präklinischen Entwicklung befinden, auf unerwünschte Wechselwirkungen an dem Enzym Acetylcholinesterase untersucht werden und somit einer Weiterentwicklung in Richtung Arzneistoff unterzogen werden.

Den Abschluss der präklinischen Untersuchungen bildet die Suche nach einem geeigneten Tiermodell anhand dessen die Wirksamkeit einer Substanz *in vivo* nachgewiesen werden kann. Die Strategie bei der Suche nach einem passenden Modell muss dabei an die Informationen angepasst werden, die für das entsprechende target verfügbar sind. Der Zugang zu etablierten Tiermodellen ermöglicht die schnellste wenn auch meist kostenintensivste Möglichkeit der Testung. Liegen von dem entsprechenden target Röntgenkristallstrukturen oder Homologiemodelle vor, so kann anhand von Dockingstudien untersucht werden, ob die untersuchte Spezies geeignet ist, um ein Proof of Concept zu erbringen. Soll lediglich aufgrund der Aminosäuresequenz beurteilt werden, ob eine Spezies geeignet ist, so können durch ein Alignment Identitäts- und auch Ähnlichkeitsmaß bestimmt werden, die als Kriterium für die Eignung einer Spezies herangezogen werden können.

Als problematisch erweist sich das Erbringen des Proof of Concept, wenn die vorangehende Wirkstoffoptimierung am humanen Target durchgeführt wurde und die Homologie zu Enzymen gängiger Tiermodelle so gering ist, dass die entsprechenden Hemmstoffe in den Tiermodellen keine Wirkung zeigen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es anhand von Sequenzalignments Vorentscheidungen bezüglich der Eignung eines Tiermodelles zu erbringen aber auch anhand von *in vitro* Versuchen diese Entscheidungen zu bestätigen und schließlich eine Spezies zu finden, die für das Erbringen des Proof of Concept geeignet ist. Bezogen auf 17 β -HSD1 würde sich dies in einer *in vivo* Wirksamkeit der *in vitro* hochaktiven und selektiven Verbindung an beispielsweise einem Endometriosemodell zeigen.

4. Ergebnisse

4.1. Development and evaluation of a FACS-based medium throughput assay for HCV entry inhibitors

Sigrid Ziegler, Bernd Kronenberger, Beatrice A.-M. Albrecht, Artur Kaul, Anna-Lena Gamer, Christian D. Klein, Rolf W. Hartmann

Revised manuscript submitted to Journal of Biomolecular Screening. 2009

Publication I.

Abstract

The interaction between the hepatitis C virus (HCV) envelope glycoprotein E2 and the human tetraspanin protein CD81 is one of the key events involved in HCV cell entry. Therefore, compounds that interfere with this interaction may be useful tools for basic research and potential drugs for the treatment of HCV infection. We describe a medium-throughput assay for ligands of the E2 binding site on the CD81 receptor. In the assay, human hepatoma cells are incubated with the test compounds and stained with a fluorescently labeled anti-CD81 antibody (JS81). Flow cytometry is used to detect the level of bound antibody, reflecting the inhibitory potencies of the compounds. Eighty percent of compounds active in our assay show efficacy in an infection assay using luciferase reporter genome in cell culture. Thus, the assay can be used as fast screening system for inhibitors of interaction of viral E2 to host cell CD81-LELs.

Introduction

Hepatitis C is a chronic disease, caused by infection with the Hepatitis C Virus (HCV), that—according to the World Health Organisation—affects about 180 million people worldwide. 1 More than three million new cases of hepatitis C are reported every year. ^{1, 2} The disease frequently leads to liver cirrhosis, which may cause other complications such as portal hypertension. The annual mortality rate of patients with chronic liver diseases as a consequence of an infection with hepatitis C is about one to five percent. ³ Current therapeutic approaches include, in particular, ribavirin combined with pegylated interferon. ⁴ However, this treatment may cause serious side-effects and is successful only with a fraction of the patients. ⁵ Therefore, novel therapeutic approaches are urgently needed. For example, viral

enzymes such as the HCV serine protease NS3 have recently gained attention as potential target proteins for the development of new anti-HCV drugs.⁶⁻⁸ A completely different strategy, which may obtain considerable importance in the future, is the prevention of viral adsorption and entry into the host cell. In the field of anti-HIV therapy, this approach is pursued with great efforts and the first HIV entry inhibitor enfuvirtide has recently entered clinical application.⁹

The entry of HCV into host cells depends on a number of cellular receptors and co-factors that include the CD81 protein and the SR-B1 scavenger receptor.¹⁰ CD81, a member of the tetraspanin family of transmembrane proteins, is one of the most prominent molecules involved in HCV entry. Its relevance for viral entry has been demonstrated by various approaches, such as binding of recombinant HCV-E2, E1-E2 complexes, HCV-pseudoparticles and viral particles.¹¹⁻¹⁶

CD81 is composed of four transmembrane domains, short intracellular domains and the two extracellular loops, SEL (small extracellular loop) and LEL (large extracellular loop).¹⁷ It has been shown that primary hepatocytes can be protected from infection by monoclonal anti-CD81 antibodies or CD81-LEL,¹¹ so that the binding region within CD81 for E2 could be identified on the LEL.¹³ Since it is known that AGM-cells (African green monkey, *Chlorocebus aethiops*) can not be infected with hepatitis C virus and that AGM-CD81 differs from human CD81 in only four amino acid residues, the binding region could be restricted further. Mutagenesis studies on these residues helped to further pinpoint the most relevant interaction sites.¹³

HCV is a virus with rapid viral kinetics, large population sizes and a quasispecies distribution.¹⁸ Given these circumstances, a combination of multiple drugs with different targets will be required to treat chronic hepatitis C.

The aim of the work presented here is to establish a reliable, fast and efficient medium-throughput assay to find compounds which can inhibit interaction between the hepatitis C virus and hepatocytes by blocking the E2 binding site on the LEL of the human CD81, the main viral anchorage protein.

In 1996 Rosa et al. published a quantitative test to determine HCV neutralizing antibodies in sera as a useful tool for studying protective immunity just as well as for the development of HCV vaccines.¹⁹ This assay was used for the quantification of antibodies, which can bind to E2 protein and thus prevent it from binding to the cellular receptor. Basically this assay was designed to look for interaction partners of E2 and for their quantification, not for inhibitors which bind to CD81-LEL and thus prevent cells from infection. This assay made use of

different sera containing diverse host specific factors and an unspecific amount of various neutralizing antibodies. Starting from this idea, we changed parameters and examined different protocols to develop and establish an assay for HCV entry inhibitors and finally prove the applicability of this procedure in medium-throughput format.

The assay we established is focused on the first step of the viral life cycle, the attachment of the virus to the host cell. This step is followed by the internalization of the virus into the target cell. In order to underline the significance of our data, we examined the next step in the viral life cycle to highlight that hits detected by our medium throughput assay affect events downstream from viral attachment to cells and thus efficiently prevent cells from being infected. Therefore we tested compounds in an infection assay with hepatitis C viral particles in cell culture and determined the intracellular amount of viral RNA after infection.

Based on our assay, large compound libraries can be screened for potential inhibitors, leading to the detection of more compounds with inhibitory potency which could be further optimized and finally to the development of a highly active antiviral compound for the treatment of chronic HCV infection.

Materials and Methods

Cells. Huh-7.5 (human hepatoma cell line) 20 cells were cultured in standard Dulbecco's modified medium (DMEM) (c.c.pro) supplemented with penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 units/ml) and ten percent fetal calf serum (Sigma). Cells were cultured at 37° C in a humidified atmosphere and an average carbon dioxide concentration of five percent in polystyrene-coated cell culture dishes (NUNCTM). Huh-7.5 cells were confirmed to be mycoplasma-free using the MycoAlert™ Detection Kit (Cambrex). Cells were detached with 0.05 percent trypsin and 0.02 percent EDTA in PBS after washing cells with PBS. The average trypsinization time amounted to ten minutes and was performed at an incubation temperature of 37° C.

Antibodies. We used the phycoerythrin (PE) labelled anti-human CD81 monoclonal antibody JS81 (Pharmingen), which can protect cells from infection.¹¹ As control we used the appropriate IgG1 kappa isotype control.

Neutralization of binding assay. Huh-7.5-cells (105 per well) were pelleted in 96 well U-bottom micro plates by centrifugation at 1.200 rpm for five minutes at 20 °C. 100 µL of inhibitor diluted in PBS to a concentration of 50 µM containing one percent DMSO was mixed with the cell pellet and incubated for ten minutes at 20°C. Cells were subsequently

incubated for ten minutes at 20 °C with fluorescently labelled JS81. Cell bound fluorescence was analysed with a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) equipped with a 488 nm argon laser. For determination of inhibitory values the assay was performed at least three times in triplicate to confirm the results.

Flow Cytometry. Cells were immunostained directly with PE-conjugated monoclonal antibodies for CD81. Flow cytometry was carried out with a fluorescent-activated cell scan (FACS) operating with cellquest software (Beckton Dickinson). The total population of viable cells was gated according to their typical forward (FSC, a linear function of cell size) and right-angle (SSC, a linear function of cell granularity) scatter. For each sample a total of 10.000 gated events were analyzed. Fluorescence from PE (FL2) was collected through a 585 nm bandpass filter. The fluorescence of cells treated with fluorescent isotype monoclonal antibodies was evaluated in each experiment to determine the level of background fluorescence of negative cells. Data were acquired on the flow cytometer. The mean fluorescence intensity (MFI) of stained cells was determined according only to positive cells.

Infectivity assay. In vitro synthesis of HCV RNA and electroporation of reporter construct Luc-JC1 were performed as described previously.^{21, 22} Culture medium was collected and thus viral particles 21 48 hours after transfection. Huh-7.5 target cells were seeded 24 hours before infection at a density of 6×10^4 cells/well in 24 well polystyrene-coated cell culture plates (NUNCTM). Cells were infected with 200 μ L inoculum containing the potential inhibitors at 5 μ M or 0.5 μ M for four hours. Concentrations were chosen according to the highest non-cytotoxic concentration of the given compound. Therefore a highly sensitive colorimetric WST-1 based assay for spectrophotometric quantification of cell proliferation, cell viability, and cytotoxicity (Roche) was performed at 50 μ M, 5 μ M, 0.5 μ M and 0.05 μ M. Concentrations were considered to be non-cytotoxic, when no reduction of conversion of WST-1 to formazan by metabolic active cells in comparison to untreated control was measured. Cells were washed, complete medium was added and cells were finally cultured for 48 hours. Afterwards cells were lysed for luciferase assay as previously described.²¹ All luciferase assays were performed at least in duplicate.

RNA preparation and quantification of viral RNA by RT-PCR. Isolation of total RNA of infected Huh-7.5 cells treated with potential inhibitors was performed as described.²³ Quantitative RT-PCR for the hepatitis C virus derived reporter construct Luc-JC1 was carried out in triplicate using the One Step RT-PCR Kit (Quiagen) using primers and probe described

before.²⁴ The amount of HCV RNA was calculated in comparison to a series of in vitro transcripts which were included in the RT-PCR.

Prediction of protein-protein interaction inhibitory potency of tested compounds.

Prediction was performed based on a decision tree described previously obtaining the following three descriptors SHP2, nRCOOR and Mor11m. The first and most relevant descriptor SHP2 is related to molecular properties like shape, size, and extension. The subsequent nRCOOR descriptor is used for elimination of compounds with ester function, which normally are considered not drug-like. The last descriptor Mor11m is related to the three-dimensional structure of a molecule.²⁵

Calculation of Z-factor. Different assay parameters were validated and evaluated based on calculation of the Z-factor, an efficient tool for the suitability just as well as the quality of assays in high throughput format.²⁶

Results

Establishment of a medium throughput assay

Since we were looking for inhibitors of the interaction between viral E2 and host cell CD81-LEL and it has been previously shown that JS81 can prevent cells from infection with HCV, we decided to choose JS81 as mimic of the viral binding site on E2. To warrant a quantitative cytofluorometric analysis of binding to CD81-LEL, we chose an antibody labelled with phycoerythrin, a marker which proved to be stable and appropriate to our assay (data not shown). Because of their high amount of CD81 molecules on cell surface, we used Huh-7.5 cell as target cells.

Parameters, which could have an impact on the outcome of the assay, were examined in detail.

Time dependency of antibody binding. In these experiments the time between addition of antibody and FACS readout was varied. Data showed that despite low intra-assay variability there were remarkable fluctuations in fluorescence readout between different assays and during the initial phase of about two hours and when the assay was performed at different days (figure 1.). It was preferable to use an incubation time in the range of a few hours to avoid the initial strong fluctuations.

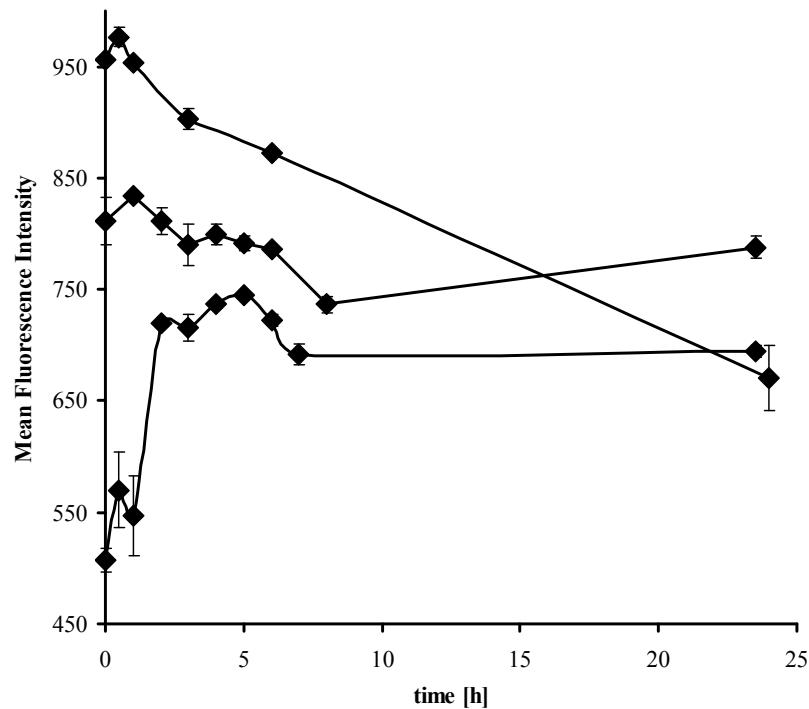


Figure 1: Cell bound PE-labelled antibody as a function of incubation time. The curves were measured on different days. For each sample 10.000 cells were analyzed. Concentration of fluorescently labelled antibody amounted to $c(\text{JS81-PE}) = 1.6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Each data point is a mean value of three independent assays. Error bars represent the standard deviation.

Examination of early fluctuations in FACS readout. The examination whether experimental parameters caused the observed and above described variations required further experiments. In the course of these analyses we examined different parameters such as saline buffer, the effect of removing free and unspecific bound antibody by washing procedures and a possible effect of fixing cells after having stained them.

The influence of these parameters is depicted in table 1. In summary, the influence of these parameters except from washing procedure which displayed a reduction of MFI-values in the range of 60 to 80 % was not pronounced. DMSO as solubilizer and trypsin/EDTA, used for stripping cells, had no influence on time dependent curve progression since reduction of MFI values lay within the range of the standard deviation of the medium throughput assay. Fixation with formaldehyde, replacement of medium by saline buffer and removal of unspecific or unbound antibodies led to a more or less pronounced shift of about 15 to 30 % towards lower MFI-values at constant curve progression. Saturation of possible binding sites of JS81 on the surface of 96-well plates with 0.1 percent BSA-solution increased MFI-values at identical time dependent curve progression compared to data collected from assays performed in untreated wells to a negligible extend below 5 %.

Table 1: Influence of several experimental parameters on cell-bound fluorescence

Modification	Objective	Effect on binding of JS81-PE [% reduction of MFI]
Aprotinine (10 µg/ml)	Inhibition of trypsin	no effect ≤ 5
DMSO (1 %)	Exclusion of cytotoxic side-effects	no effect ≤ 5
Formaldehyde (1 %)	“Fixation” of cells and bound antibody	decrease 15 – 30
RPMI-medium instead of PBS *	Exclusion of effects caused by change of medium between cultivation and assay	decrease 15 – 30
Washing procedure	Removal of unbound antibody	pronounced decrease 60 – 80
BSA (0.1 %)	Saturation of protein binding sites on the container surface	negligible increase 5 – 10

The initial decrease fluctuations in fluorescence intensity could not be prevented by any of these modifications, including “fixation” with formaldehyde. The presence of DMSO in concentrations up to one percent was unproblematic.

All modifications performed led to assays with Z-factors higher than 0.6 (data not shown) and thus to excellent assay. Nevertheless none of them turned out to increase the Z-factor of the medium throughput assay described in the experimental section calculated to a value of 0.82.

Unlabeled antibody as model “inhibitor”. Data displayed in figure 2 confirm that cell-bound fluorescence ascends with increasing concentration of fluorescently labelled antibody, when cells were not preincubated with unlabelled antibody. Preincubation with unlabeled JS81 displays competition for binding site on CD81. We were able to show that increasing concentrations of unlabeled JS81 can displace raising amounts of JS81-PE. At a concentration of $c(\text{JS81}) = 1.6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ MFI nearly declined to background level, implicating that almost all antibody binding sites on Huh-7.5 cells were occupied by unlabelled JS81. We therefore decided to perform the assay at a concentration of $c(\text{JS81-PE}) = 1.6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

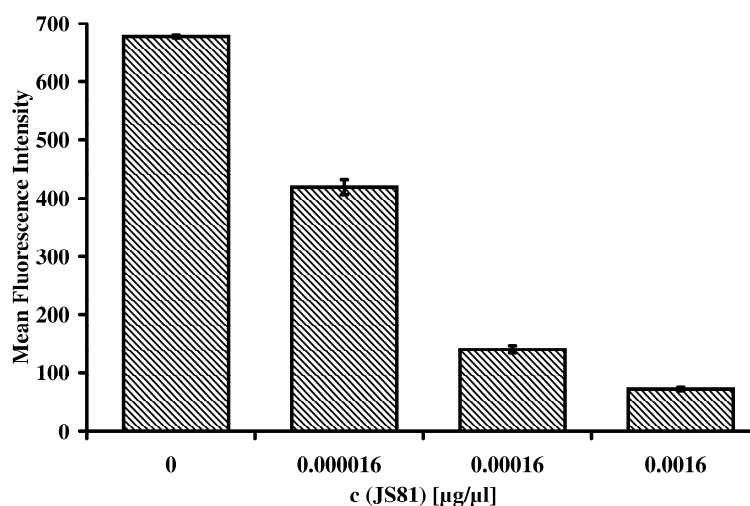


Figure 2: Effect of unlabeled antibody at various concentrations

Each data point is the mean of three independent measurements. Error bars indicate the standard deviation.

Assay volume. Data showed that at a given concentration of antibody there was no significant difference in cell-bound fluorescence at various assay volumes (data not shown). We therefore decided to perform the assay at an easily manageable and concerning antibody economic assay volume of 250 µL.

Assay temperature. Cell-bound fluorescence constantly declined with decreasing assay temperature, implicating that low temperatures effectuate lower efficiency in antibody binding to CD81. Identical concentrations of unlabelled JS81 were able to displace increasing amounts of JS81-PE at raising assay temperature (data not shown). Given these data we decided to perform the assay at room temperature.

Screening of compounds

After the assay conditions had been established, it was validated and its appropriability for being used in a medium throughput format was investigated by testing 550 compounds for their ability to reduce antibody binding to target cells and thus reduce viral attachment to Huh-7.5 cells. Tests were performed according to the medium throughput assay described in the experimental section.

The compound library tested was composed of about 290 compounds from the inhouse library, 180 natural compounds and 80 terfenadine derivatives. The latter had been synthesized after preliminary results had shown that terfenadine was a fairly active compound showing an inhibition value of 26 %.²⁷

A total of 50 compounds showed a significant inhibitory activity with a reduction of MFI values of more than 10 %. An overall of 23 compounds, consisting of 20 terfenadine derivatives, tamoxifen, epigallocatechin and cannabigerole, displayed medium inhibitory activity with inhibition values between 30 and 70 %. 27 compounds, consisting of nine terfenadine derivatives and 18 structurally diverse natural compounds showed moderate activity with inhibition values between 10 and 30 %. Examples for compounds with moderate activity are terfenadine (26 %), benzyl salicylate (25 %), nordihydroguaiaretic acid (19 %), xanthohumol (18 %) and ouabain (10 %). The most potent compound, the terfenadine derivative MH212 reduced MFI values by 71 %.²⁷ The relevance of these data was further investigated as described below.

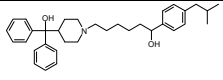
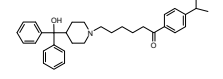
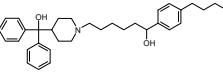
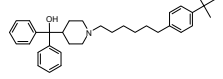
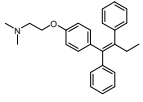
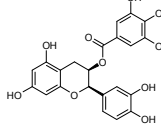
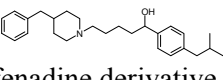
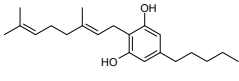
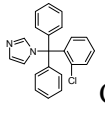
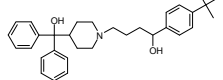
Confirmation of the assay

A total of ten compounds were examined in detail. For this purpose Huh-7.5 cells were infected with Hepatitis C viral particles in absence or presence of potential inhibitors. Assay and analysis of data were performed as described in the experimental section. As parameters for a reduction of infection luciferase activity, encoded by the modified viral genome, just as well as the intracellular amount of viral RNA were determined.

Eight out of these ten compounds displayed a pronounced reduction of luciferase activity of more than 20 %. All five tested terfenadine derivatives and terfenadine itself displayed a medium reduction of luciferase activity between 30 and 60 %. Tamoxifen reduced luciferase activity by 65 %, epicatechin gallate by 11 %. The compounds cannabigerol and clotrimazole showed no reduction in luciferase activity. A possible explanation for the lack of inhibitory potency could be the tenfold reduced concentration of test compound in the infection assay in comparison to the medium throughput assay. Obviously there was a significant correlation between reduction of MFI values and reduction of luciferase activity in infection assay with HCVcc.

Four out of the above mentioned ten compounds were further investigated by quantitative RT-PCR. Here the intracellular amount of viral RNA was quantified after infection with HCVcc. All four tested compounds reduced significantly the intracellular amount of viral RNA (table 2) by at least 19 %. There seemed to be a correlation between reduction of luciferase activity and amount of intracellular RNA (table 2).

Table 2: Compendium of inhibition data

Structure	Reduction of MFI ^a	Reduction of luciferase at [μM] ^b	PPII [true / false] ^c	Reduction of HCV RNA [%] ^d
 Terfenadine derivative MH212	71	32 [0.5 μM] *	true	n. d.
 Terfenadine derivative MH182	63	43 [0.5 μM] *	true	n. d.
 Terfenadine derivative MH191	49	40 [0.5 μM] *	true	n. d.
 Terfenadine derivative BA40	33	40 [0.5 μM] *	true	29 [0.5 μM]
 Tamoxifen	32	65 [5 μM]	false	38 [5 μM]
 Epicatechin gallate	31	11 [5 μM]	false	n. d.
 Terfenadine derivative SR9	30	61 [5 μM]	false	45 [5 μM]
 Cannabigerol	30	not active [5 μM]	false	n. d.
 Clotrimazole	27	not active [5 μM]	false	n. d.
 Terfenadine	26	30 [0.5 μM] *	true	19 [0.5 μM]

a. Reduction of mean fluorescence intensity (MFI) of Huh-7.5 cells after treatment with the given compounds at 50 μM determined by FACS analysis. Standard deviation: ≤ 6 % **b.** Reduction of luciferase activity of infected Huh-7.5 cells after treatment with different chemical compounds at the denoted concentration. Standard deviation: ≤ 8 % **c.** PPII protein-protein interaction inhibitor according to Neugebauer et al. 2007 **d.** Reduction of intracellular viral RNA after infection of Huh-7.5 cells with HCVcc determined by quantitative RT-PCR. Standard deviation: ≤ 10 %.

* Concentration was set to 0.5 μM after cytotoxic effects were detected at 5 μM

Discussion and conclusions

The aim of this study was to develop a reproducible, cell based high-throughput assay to investigate potential HCV entry inhibitors. The assay procedure described here delivers very reliable results evidenced by the Z-factor of 0.82. This is clearly underlined by the very low and often negligible, standard deviations for individual data points in all experiments described. It appears feasible to use this assay for the sensitive evaluation of even small changes in CD81 density on the cellular surface, and for the assessment of compounds that either bind to CD81 in a manner competitive to the antibody or that influence CD81 in any other way.

Based on this assay large compound libraries including structurally diverse compound classes can be screened for searching for further compounds with inhibitory potency. These compounds as well as terfenadine and its derivatives could be further modified and thus optimized concerning their potency to reduce viral entry into host cells.

High throughput screening systems are favoured methods for rapid identification of active compounds of different compounds classes. For this reason there have been developed several high throughput screening assays e.g. for HCV RNA replication inhibitors aiming at finding novel therapeutic approaches in HCV treatment.²⁸ So far no screening system for hepatitis C virus entry inhibitors have been published. Regarding the human immunodeficiency virus (HIV) there are promising screening systems published for entry inhibitors leading to hit compounds inhibiting cell-cell fusion in low micromolar range.²⁹ These data are encouraging since the most promising compounds we found display inhibitory values of more than 70 % reduction of MFI-values at 50 μ M.

In conclusion, the medium throughput assay for HCV entry inhibitors we have developed is a reliable, fast and cost efficient assay that measures reduction of antibody binding to CD81 mimicking binding of HCV to target cells.

Acknowledgements

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft as part of the Clinical Research Group KFO 129. C.K. gratefully acknowledges financial support by the Emmy-Noether-Programm (DFG KL 1356) and the Fonds der Chemischen Industrie.

References

1. WHO, http://www.who.int/vaccine_research/diseases/viral_cancers/en/index2.html. 2006.
2. Sy, T. and M.M. Jamal, Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci*, 2006, 3, 41-6.
3. CDC, <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/c/fact.htm>. 2005.
4. McHutchison, J.G., S.C. Gordon, E.R. Schiff, M.L. Shiffman, W.M. Lee, V.K. Rustgi, Z.D. Goodman, M.H. Ling, S. Cort, and J.K. Albrecht, Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med*, 1998, 339, 1485-92.
5. Hadziyannis, S.J., H. Sette, Jr., T.R. Morgan, V. Balan, M. Diago, P. Marcellin, G. Ramadori, H. Bodenheimer, Jr., D. Bernstein, M. Rizzetto, S. Zeuzem, P.J. Pockros, A. Lin, and A.M. Ackrill, Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med*, 2004, 140, 346-55.
6. Chen, S.H. and S.L. Tan, Discovery of small-molecule inhibitors of HCV NS3-4A protease as potential therapeutic agents against HCV infection. *Curr Med Chem*, 2005, 12, 2317-42.
7. Goudreau, N. and M. Llinas-Brunet, The therapeutic potential of NS3 protease inhibitors in HCV infection. *Expert Opin Investig Drugs*, 2005, 14, 1129-44.
8. Kwong, A.D., J.L. Kim, G. Rao, D. Lipovsek, and S.A. Raybuck, Hepatitis C virus NS3/4A protease. *Antiviral Res*, 1999, 41, 67-84.
9. Chen, R.Y., J.M. Kilby, and M.S. Saag, Enfuvirtide. *Expert Opin Investig Drugs*, 2002, 11, 1837-43.
10. Bartosch, B., A. Vitelli, C. Granier, C. Goujon, J. Dubuisson, S. Pascale, E. Scarselli, R. Cortese, A. Nicosia, and F.L. Cosset, Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem*, 2003, 278, 41624-30.
11. Bartosch, B., J. Dubuisson, and F.L. Cosset, Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med*, 2003, 197, 633-42.
12. Drummer, H.E., A. Maerz, and P. Poubourios, Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *FEBS Lett*, 2003, 546, 385-90.
13. Drummer, H.E., K.A. Wilson, and P. Poubourios, Identification of the hepatitis C virus E2 glycoprotein binding site on the large extracellular loop of CD81. *J Virol*, 2002, 76, 11143-7.
14. Higginbottom, A., E.R. Quinn, C.C. Kuo, M. Flint, L.H. Wilson, E. Bianchi, A. Nicosia, P.N. Monk, J.A. McKeating, and S. Levy, Identification of amino acid residues in CD81

- critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J Virol*, 2000, *74*, 3642-9.
15. Patel, A.H., J. Wood, F. Penin, J. Dubuisson, and J.A. McKeating, Construction and characterization of chimeric hepatitis C virus E2 glycoproteins: analysis of regions critical for glycoprotein aggregation and CD81 binding. *J Gen Virol*, 2000, *81*, 2873-83.
 16. Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A.J. Weiner, M. Houghton, D. Rosa, G. Grandi, and S. Abrignani, Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, 1998. 282(5390): p. 938-41.
 17. Levy, S., S.C. Todd, and H.T. Maecker, CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 1998, *16*, 89-109.
 18. Pawlotsky, J.M., Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clin Liver Dis*, 2003, *7*, 45-66.
 19. Rosa, D., S. Campagnoli, C. Moretto, E. Guenzi, L. Cousens, M. Chin, C. Dong, A.J. Weiner, J.Y. Lau, Q.L. Choo, D. Chien, P. Pileri, M. Houghton, and S. Abrignani, A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, *93*, 1759-63.
 20. Blight, K.J., J.A. McKeating, and C.M. Rice, Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*, 2002, *76*, 13001-14.
 21. Koutsoudakis, G., A. Kaul, E. Steinmann, S. Kallis, V. Lohmann, T. Pietschmann, and R. Bartenschlager, Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol*, 2006, *80*, 5308-20.
 22. Kato, T., T. Date, M. Miyamoto, A. Furusaka, K. Tokushige, M. Mizokami, and T. Wakita, Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology*, 2003, *125*, 1808-17.
 23. Kaul, A., I. Woerz, P. Meuleman, G. Leroux-Roels, and R. Bartenschlager, Cell culture adaptation of hepatitis C virus and in vivo viability of an adapted variant. *J Virol*, 2007, *81*, 13168-79.
 24. Pietschmann, T., V. Lohmann, A. Kaul, N. Krieger, G. Rinck, G. Rutter, D. Strand, and R. Bartenschlager, Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol*, 2002, *76*, 4008-21.
 25. Neugebauer, A., R.W. Hartmann, and C.D. Klein, Prediction of protein-protein interaction inhibitors by chemoinformatics and machine learning methods. *J Med Chem*, 2007, *50*, 4665-8.

26. Zhang, J.H., T.D. Chung, and K.R. Oldenburg, A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen*, 1999, *4*, 67-73.
27. Holzer, M., S. Ziegler, B. Albrecht, B. Kronenberger, A. Kaul, R. Bartenschlager, L. Kattner, C.D. Klein, and R.W. Hartmann, Identification of terfenadine as an inhibitor of human CD81-receptor HCV-E2 interaction: synthesis and structure optimization. *Molecules*, 2008, *13*, 1081-110.
28. Hao, W. and R. Duggal, High-throughput screening of HCV RNA replication inhibitors by means of a reporter replicon system. *Methods Mol Biol*, 2009, *510*, 243-50.
29. Cai, L. and M. Gochin, A novel fluorescence intensity screening assay identifies new low-molecular-weight inhibitors of the gp41 coiled-coil domain of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, *51*, 2388-95.

4.2. Structural modifications of salicylates: Inhibitors of human CD81-receptor HCV-E2 interaction

Holzer M., Sigrid Ziegler, Alexander Neugebauer, Bernd Kronenberger, Christian D. Klein, Rolf W. Hartmann

This manuscript has been published as an article in the
Archiv der Pharmazie, 2008, **341**, 478-484

Publication II.

Abstract

Starting point of the present paper was the result of a virtual screening using the open conformation of the large extracellular loop (LEL) of the CD81-receptor (crystal structure: PDB-ID: 1G8Q). After benzyl salicylate had been experimentally validated to be a moderate inhibitor of the CD81-LEL–HCV-E2 interaction, further optimization was performed and heterocyclic substituted benzyl salicylate derivatives were synthesized. The compounds were tested for their ability to inhibit the interaction of a fluorescence labeled antibody to CD81-LEL using Huh-7.5 cells. No compound showed an increase concerning the inhibition of the protein-protein interaction compared to benzyl salicylate.

Introduction

Hepatitis C Virus (HCV), a positive-stranded RNA virus, infects approximately 170 million people worldwide.¹ The majority of those infected fail to clear the virus under current therapy and in many cases the chronic infection with HCV leads to cirrhosis or liver cancer.² Recently the *large extracellular loop* (LEL) of the human cell surface protein CD81, a member of the tetraspanin family, was identified as a binding partner for the HCV envelope glycoprotein E2 (HCV-E2).³ Inhibition of this interaction prevents infection of HCV target cells, mainly human hepatocytes. This has been demonstrated using several methods including a small molecule LEL-D-helix mimetic that binds to HCV-E2.⁴ Following our aim to synthesize compounds which inhibit the CD81-LEL–HCV-E2 interaction by binding to CD81-LEL, a virtual screening using the crystal structure of the latter protein was performed.

More than 400.000 compounds obtained from the Available Chemicals Directory, the National Cancer Institute Database, the Maybridge Database and the inhouse-substance library of our group were used. Subsequently reactive compounds were excluded as well as compounds which do not follow Lipinski's *Rule-of-Five*. Approximately 100.000 compounds

were then docked into the CD81-LEL crystal structure (PDB-ID: 1G8Q) by means of GOLD, DOCK and FlexX software. The docking site within the 1G8Q structure was a superficial cleft that is localized between two alpha-helical parts of the LEL with pronounced conformational flexibility.⁵ There are indications that this part of the LEL is involved in the virus binding process⁶ and we hypothesized that conformational changes – which can possibly be blocked by small-molecular ligands – in that area may be linked to virus binding and internalization. Moreover, the cleft-like region in 1G8Q appeared as a more promising binding site for small-molecular ligands than other, purely superficial regions of LEL. About 200 virtual *hits* were identified. Selected compounds (criteria were commercial availability or easy synthetic route) were tested using the assay developed by Pileri et al.⁷ The best compound found was benzyl salicylate (figure 1), which was capable to inhibit the CD81-LEL–HCV-E2 interaction by 25 % at 50 μ M.

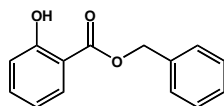
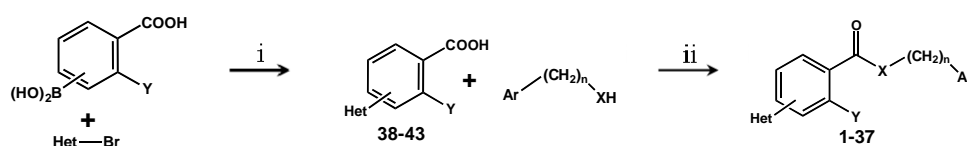


Figure 1: Benzyl salicylate.

Results and discussion

Structure modification. After experimental validation of benzyl salicylate as a hit compound, structural optimizations were performed to increase inhibition of protein-protein interaction. The aim was to synthesize compounds with a core structure similar to benzyl salicylate in which the aromatic ring containing the carboxyl function should be coupled to variable heterocycles to improve drug-likeness. Furthermore a few compounds with heterocyclic substitution at the benzyl alcohol moiety were prepared.

Syntheses and biological testing. The desired compounds were obtained by connecting substituted benzoic acids to alcohols and amines, respectively. The synthetic pathway and a general structure of the synthesized benzyl salicylate derivatives are shown in scheme 1, the compounds prepared are outlined in table 1. Formation of the amides and esters was accomplished by activating the carboxylic acids with thionyl chloride followed by addition of the corresponding alcohols or amines.



Scheme 1. Reagents and conditions: (i) 10 ml EtOH + 15 ml 10 % Na_2CO_3 -solution, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, O_2 -free, 90 °C over night (ii) 1. SOCl_2 , rt, 2h 2. NEt_3 , dry CH_2Cl_2 , 0 °C 30 min, rt 2h (Het = heterocycle, X = -O-, -NH-, Y = -H, -OH, Ar = arom, n = 0, 1).

The carboxylic acids needed for the formation of the target compounds were prepared using commercially available reagents. Starting from the bromo-substituted aromatic heterocycle and the corresponding boronic acid Suzuki coupling was performed with tetrakis-(triphenylphosphine) palladium (0) as catalyst and the desired compounds (**38-43**) obtained in satisfactory yields (scheme 1).

The alcohols and amines used for the formation of the target compounds were commercially available with the exception of **44-46** (table 1). These had to be prepared starting from the bromo-substituted heterocycle and the boronic acid of the corresponding alcohol or amine via Suzuki coupling, performed as mentioned above.



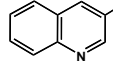




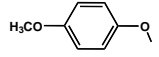
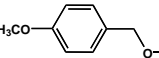
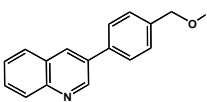



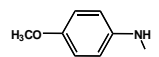
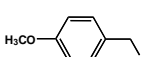
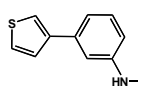
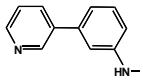
R	Het					11
	Het					
						
	1	2	3	4	5	
	6	7	8	9	10	11
				12	13	
				14	15	
	44		16		17	
	18	19		20	21	
	22	23	24		25	26
		27	28	29	30	
				31	32	
				33		
	45	34				
	46	35		36	37	

Table 1. Synthesized compounds (1-37).

Biological testing of the synthesized compounds **1-37** was performed by means of a medium-throughput assay developed in our group⁸ which is based on the procedure of Pileri et al⁷. Briefly, the inhibition of the interaction of the fluorescence-labeled CD81 antibody JS81 with Huh-7.5 cells caused by our compounds is determined by FACS. No synthesized compound showed an increase concerning the inhibition of the CD81-LEL-HCV-E2 interaction compared to the original hit benzyl salicylate. The probable point of contact of our compounds should be the cleft-like region of the LEL as shown in the above mentioned docking studies. However, it can not be excluded that our compounds in addition also interact with the E2 mimicking epitope of the antibody.

A possible explanation for the low activity of the compounds might be an unfavorable substitution pattern of the core structure that diminishes binding affinity to the LEL compared to the original hit. Therefore we are currently looking for an appropriate substitution pattern to solve this problem.

Acknowledgment

We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) for the grants given to M.H., S.Z. and A.N. (KFO129) and the Fonds der Chemischen Industrie for financial support.

Experimental section

General procedure. Solvents and reagents were used as received from commercial distributors without further purification. Anhydrous reactions were conducted under a nitrogen atmosphere. Proton and carbon NMR spectra were recorded at a Bruker AM 500. The proton NMR spectra were recorded at 500 MHz, the carbon NMR spectra at 125 MHz. Chemical shifts δ are reported in ppm units. Molecular mass was determined by liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using a TSQ Quantum from Thermo Finnigan equipped with an electro spray interface and connected to a Surveyor HPLC (Thermo Finnigan). Positive and negative ion mass spectra were recorded (mass range m/z 150–1500) in normal scan mode. Melting points were determined using a Stuart Scientific SMP3 melting point apparatus. IR measurements were performed on a Bruker Vector 33 at a frequency range from 4000–250 cm^{-1} . Wave numbers ν are reported in cm^{-1} . Flash chromatography was performed using Merck silica gel 35/40–63/70.

General procedure for the Suzuki Coupling. The boronic acid (1 equivalent) and the bromo substituted heterocycle (1 equivalent) were added to a mixture of 10 ml ethanol and 15 ml sodium carbonate solution (10 %). This solution was freed from oxygen by evacuating and

flushing with nitrogen several times. After addition of 4 mol % of tetrakis-(triphenylphosphine) palladium(0) under nitrogen the mixture was stirred at 90 °C over night. Work-up for the carboxylic acids: The remaining solid was filtered off at that temperature. Subsequently half of the solvent was removed. The product precipitated after acidifying to pH 2 using formic acid. It was then filtered off and dried under high vacuum.

Work-up for the alcohol and amines: After extracting the aqueous phase two times with ethyl acetate, the organic layer was dried and the solvent removed. Flash column chromatography (ethyl acetate/n-hexane mixture) led to the purified product.

General procedure for the formation of the amides and esters. The carboxylic acid (1 equivalent) was stirred with an excess of thionyl chloride for 2 hours at room temperature. The resulting clear solution was freed from remaining thionyl chloride under reduced pressure. The acid chloride was dissolved in dry dichloromethane and added drop wise at 0 °C to a solution consisting of the corresponding alcohol or amine (1 equivalent) and an equimolar amount of triethylamine in dry dichloromethane. After stirring for 30 minutes at 0 °C the mixture was warmed to room temperature and stirred for 2 hours. The precipitated solid was filtered off. The solvent was removed and the raw product was purified by column flash chromatography using an ethyl acetate/n-hexane mixture.

Biological test system. Huh-7.5 cells ($1 \cdot 10^5$) were incubated with 100 μ l of the potential inhibitor (50 μ M + 1 % DMSO) in 96 transwell plates for 10 minutes at room temperature. Next 4 μ l of the fluorescence-labeled CD81 antibody JS81 and 21 μ l of PBS were added. After 10 minutes at room temperature 125 μ l of PBS were added and the resulting cell suspension was left to incubate in darkness for 5 hours. After addition of 250 μ l of PBS FACS analyses followed.

Phenyl 4-(thiophen-3-yl)benzoate (1). Yield 43 %. mp 155 °C IR 1719, 1605, 1487, 1278, 1195, 1160, 1079 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.23 (2 H, d, J = 8.51), 7.73 (2 H, d, J = 8.83), 7.62–7.61 (1 H, m), 7.48–7.43 (4 H, m), 7.30–7.28 (1 H, m), 7.26–7.24 (2 H, m) ¹³C-NMR (CDCl₃) 164.95, 151.02, 141.08, 140.70, 130.83, 129.49, 128.01, 127.50, 126.81, 126.37, 126.19, 125.86, 122.15, 121.74 LC/MS-MS 280.96 (M+H⁺).

Phenyl 4-(pyridin-3-yl)benzoate (2). Yield 45 %. mp 110 °C IR 2925, 2360, 1730, 1266, 1190, 1073 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.69 (1 H, s), 8.57 (1 H, dd, J = 4.73), 8.23 (2 H, d, J = 8.51), 7.84 (1 H, dt, J = 7.88), 7.63 (2 H, d, J = 8.51), 7.37–7.30 (3 H, m), 7.21–7.16 (3 H, m) ¹³C-NMR (CDCl₃) 164.77, 150.93, 149.43, 148.39, 42.90, 135.41, 134.50, 130.94, 129.52, 129.19, 127.27, 125.97, 123.68, 121.67 LC/MS-MS 276.20 (M+H⁺).

Phenyl 4-(quinolin-3-yl)benzoate (3). Yield 43 %. mp 137 °C IR 3057, 2924, 1728, 1608, 1492, 1269, 1197, 1082 ¹H-NMR (CDCl₃) 9.15 (1 H, s), 8.31 (1 H, s), 8.27 (2 H, d, J = 8.51), 8.01 (1 H, d, J = 8.51), 7.85 (1 H, d, J = 6.94), 7.78 (2 H, d, J = 8.51), 7.71–7.68 (1 H, m), 7.56–7.52 (1 H, m), 7.39–7.36 (2 H, m), 7.23–7.17 (3 H, m)

^{13}C -NMR (CDCl_3) 164.83, 150.96, 149.47, 147.82, 142.99, 133.86, 131.04, 130.00, 129.53, 129.36, 129.16, 128.17, 127.85, 127.52, 127.32, 125.98, 121.69 LC/MS-MS 326.17 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Phenyl 4-(pyridin-4-yl)benzoate (4). Yield 39 %. mp 146 °C IR 3043, 2928, 1725, 1592, 1486, 1401, 1272, 1185, 1085 ^1H -NMR (CDCl_3) 8.65 (2 H, s), 8.24 (2 H, d, $J = 8.51$), 7.70 (2 H, d, $J = 8.51$), 7.48 (2 H, s), 7.39–7.36 (2 H, m), 7.23–7.20 (1 H, m), 7.18–7.16 (2 H, m) ^{13}C -NMR (CDCl_3) 164.67, 150.89, 150.50, 147.06, 143.18, 130.95, 130.06, 129.55, 127.24, 126.03, 121.75, 121.64 LC/MS-MS 276.27 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Phenyl 4-(pyrimidin-5-yl)benzoate (5). Yield 59 %. mp 141 °C IR 3064, 2926, 1726, 1610, 1554, 1489, 1414, 1268, 1183, 1077 ^1H -NMR (CDCl_3) 9.28 (1 H, s), 9.03 (2 H, s), 8.35 (2 H, d, $J = 8.83$), 7.73 (2 H, d, $J = 8.51$), 7.47–7.43 (2 H, m), 7.31–7.28 (1 H, m), 7.26–7.23 (2 H, m) ^{13}C -NMR (CDCl_3) 164.52, 158.25, 155.06, 150.85, 139.27, 133.28, 131.23, 130.13, 129.56, 127.17, 126.08, 121.61 LC/MS-MS 277.25 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Benzyl 4-(thiophen-3-yl)benzoate (6). Yield 58 %. mp 138 °C IR 1705, 1607, 1267, 1105 ^1H -NMR (CDCl_3) 8.11 (2 H, d, $J = 8.51$), 7.66 (2 H, d, $J = 8.51$), 7.57–7.56 (1 H, m), 7.48–7.47 (2 H, m), 7.43–7.36 (5 H, m), 5.39 (2 H, s) ^{13}C -NMR (CDCl_3) 164.50, 139.47, 138.47, 134.42, 128.64, 126.89, 126.53, 126.45, 124.98, 124.51, 124.47, 120.22, 64.96 LC/MS-MS 294.18 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Benzyl 4-(pyridin-3-yl)benzoate (7). Yield 44 %. mp 98 °C IR 2925, 1708, 1455, 1379, 1272, 1097 ^1H -NMR (CDCl_3) 8.88 (1 H, s), 8.65 (1 H, s), 8.18 (2 H, d, $J = 8.51$), 7.90 (1 H, dt, $J = 7.88$), 7.65 (2 H, d, $J = 8.83$), 7.48–7.46 (2 H, m), 7.42–7.34 (4 H, m), 4.67 (2 H, s) ^{13}C -NMR (CDCl_3) 166.03, 149.29, 148.37, 142.37, 135.97, 134.45, 130.48, 129.76, 128.63, 128.19, 127.10, 123.64, 66.85 LC/MS-MS 290.19 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Benzyl 4-(quinolin-3-yl)benzoate (8). Yield 15 %. mp 125 °C IR 3034, 2963, 1707, 1610, 1454, 1266, 1100 ^1H -NMR (CDCl_3) 9.19 (1 H, s), 8.35 (1 H, s), 8.22 (2 H, d, $J = 8.51$), 8.15 (1 H, d, $J = 8.51$), 7.91–7.90 (1 H, m), 7.80–7.74 (3 H, m), 7.62–7.59 (1 H, m), 7.49–7.48 (2 H, m), 7.43–7.35 (3 H, m), 5.42 (2 H, s) ^{13}C -NMR (CDCl_3) 166.08, 149.49, 147.71, 142.43, 135.99, 133.78, 132.70, 130.58, 129.91, 129.74, 129.31, 128.65, 128.32, 128.20, 128.13, 127.85, 127.64, 127.36, 127.27, 126.98, 66.88 LC/MS-MS 340.31 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Benzyl 4-(pyridin-4-yl)benzoate (9). Yield 20 %. IR 3035, 2926, 1716, 1595, 1401, 1268, 1101 ^1H -NMR (CDCl_3) 8.61 (2 H, d, $J = 5.68$), 8.10 (2 H, d, $J = 8.51$), 7.60 (2 H, d, $J = 8.51$), 7.42 (2 H, d, $J = 5.99$), 7.39 (2 H, m), 7.33–7.26 (3 H, m), 5.31 (2 H, s) ^{13}C -NMR (CDCl_3) 164.87, 149.42, 146.12, 134.87, 129.46, 127.62, 127.20, 126.84, 126.02, 124.77, 120.66, 65.90 LC/MS-MS 290.19 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Benzyl 4-(pyrimidin-5-yl)benzoate (10). Yield 36 %. mp 78 °C IR 2924, 2855, 1716, 1611, 1554, 1418, 1375, 1268 ^1H -NMR (CDCl_3) 9.25 (1 H, s), 8.98 (1 H, s), 8.21 (2 H, d, $J = 8.51$), 7.65 (2 H, d, $J = 8.83$), 7.48–7.46 (2 H, m), 7.42–7.34 (2 H, m), 5.40 (2 H, s) ^{13}C -NMR (CDCl_3) 165.73, 158.11, 154.98, 138.69, 135.78, 133.35, 130.75, 128.63, 128.37, 128.23, 126.97, 67.00 LC/MS-MS 291.24 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Benzyl 2-hydroxy-5-(pyridin-3-yl)benzoate (11). Yield 46 %. IR 3033, 2926, 2855, 1675, 1594, 1472, 1387, 1203 ^1H -NMR (CDCl_3) 10.87 (1 H, s), 8.82 (1 H, s), 8.59 (1 H, s), 8.10 (1 H, s), 7.83–7.81 (1 H, m), 7.68 (1 H, dd, $J = 8.51$), 7.50–7.46 (2 H, m), 7.44–7.34 (4 H, m), 7.11 (1 H, d, $J = 8.83$), 5.44 (2 H, s) ^{13}C -NMR (CDCl_3)

169.71, 161.81, 148.26, 147.90, 135.11, 134.41, 133.91, 129.09, 128.79, 128.70, 128.44, 128.39, 127.88, 125.81, 123.59, 123.56, 118.60, 112.92, 67.32 LC/MS-MS 306.15 (M+H⁺).

4-Methoxyphenyl 4-(pyridin-4-yl)benzoate (12). Yield 48 %. mp 171 °C IR 2964, 1724, 1592, 1504, 1460, 1277, 1177, 1081 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.85 (2 H, d, *J* = 6.67), 8.43 (2 H, d, *J* = 8.39), 8.15 (2 H, d, *J* = 6.65), 7.89 (2 H, d, *J* = 8.38), 7.16 (2 H, d, *J* = 9.04), 6.97 (2 H, d, *J* = 9.08), 3.84 (3 H, s) ¹³C-NMR (CDCl₃) 167.07, 157.07, 148.78, 138.18, 136.10, 130.09, 129.00, 127.91, 126.16, 121.50, 55.54 LC/MS-MS 306.01 (M+H⁺).

4-Methoxyphenyl 4-(pyrimidin-5-yl)benzoate (13). Yield 29 %. mp 156 °C IR 2934, 1725, 1607, 1555, 1504, 1420, 1339, 1248, 1180, 1069 ¹H-NMR (CDCl₃) 9.27 (1 H, s), 9.02 (2 H, s), 8.34 (2 H, d, *J* = 8.49), 7.73 (2 H, d, *J* = 8.49), 7.16 (2 H, d, *J* = 9.03), 6.96 (2 H, d, *J* = 9.04), 3.84 (3 H, s) ¹³C-NMR (CDCl₃) 164.85, 161.28, 157.14, 154.29, 146.36, 134.52, 130.89, 130.42, 124.78, 123.56, 114.29, 55.49 LC/MS-MS 307.97 (M+H⁺).

4-Methoxybenzyl 4-(pyridin-4-yl)benzoate (14). Yield 13 %. mp 162 °C IR 2925, 1629, 1548, 1512, 1417, 1297, 1255, 1178, 1024 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.62 (2 H, d, *J* = 6.03), 8.10 (2 H, d, *J* = 8.52), 7.61 (2 H, d, *J* = 8.53), 7.45 (2 H, d, *J* = 6.15), 7.34 (2 H, d, *J* = 8.68), 6.86 (2 H, d, *J* = 8.70), 5.26 (2 H, s), 3.75 (3 H, s) ¹³C-NMR (CDCl₃) 167.16, 160.45, 149.89, 148.65, 138.14, 131.19, 130.82, 130.34, 129.08, 126.08, 121.46, 113.75, 67.15, 55.39 LC/MS-MS 320.14 (M+H⁺).

4-Methoxybenzyl 4-(pyrimidin-5-yl)benzoate (15). Yield 50 %. mp 165 °C IR 1709, 1610, 1513, 1414, 1276, 1241, 1184, 1097, 1028 ¹H-NMR (CDCl₃) 9.61 (1 H, s), 8.89 (2 H, s), 8.53 (2 H, d, *J* = 8.53), 7.56 (2 H, d, *J* = 8.54), 7.32 (2 H, d, *J* = 8.69), 6.84 (2 H, d, *J* = 8.70), 5.25 (2 H, s), 3.74 (3 H, s) ¹³C-NMR (CDCl₃) 167.07, 161.32, 160.65, 154.31, 133.61, 131.19, 130.88, 130.28, 129.02, 126.25, 123.35, 113.65, 67.16, 55.48 LC/MS-MS 321.00 (M+H⁺).

4-(Quinolin-3-yl)benzyl 4-(quinolin-3-yl)benzoate (16). Yield 20 %. mp 190 °C IR 2925, 1718, 1608, 1494, 1273, 1116 ¹H-NMR (CDCl₃) 9.21–9.19 (2 H, m), 8.36 (1 H, s), 8.32 (1 H, s), 8.25 (2 H, d, *J* = 8.22), 8.17–8.14 (2 H, m), 7.90 (2 H, t, *J* = 7.61), 7.81 (2 H, d, *J* = 8.22), 7.78–7.72 (4 H, m), 7.66–7.56 (4 H, m), 5.50 (2 H, s) ¹³C-NMR (CDCl₃) 166.09, 149.50, 147.74, 147.45, 142.56, 137.98, 135.98, 133.53, 133.30, 132.64, 130.61, 129.95, 129.53, 129.33, 128.14, 128.03, 127.84, 127.71, 127.41, 127.29, 66.48 LC/MS-MS 467.40 (M+H⁺).

4-(Quinolin-3-yl)benzyl 4-(pyrimidin-5-yl)benzoate (17). Yield 29 %. mp 166 °C IR 3031, 1713, 1611, 1555, 1417, 1265, 1185, 1094 ¹H-NMR (CDCl₃) 9.25 (1 H, s), 9.18 (1 H, s), 8.99 (2 H, s), 8.31 (1 H, s), 8.24 (2 H, d, *J* = 8.22), 8.13 (1 H, d, *J* = 8.53), 7.88 (1 H, d, *J* = 7.92), 7.76–7.72 (3 H, m), 7.67 (2 H, d, *J* = 7.92), 7.62 (2 H, d, *J* = 8.22), 7.60–7.57 (1 H, m), 5.48 (2 H, s) ¹³C-NMR (CDCl₃) 165.78, 158.15, 155.02, 149.74, 147.42, 138.82, 138.04, 135.78, 133.30, 133.24, 130.81, 130.52, 129.58, 129.25, 129.13, 128.02, 127.96, 127.72, 127.05, 66.63 LC/MS-MS 418.27 (M+H⁺).

N-Phenyl-4-(thiophen-3-yl)benzamide (18). Yield 19 %. mp 165 °C IR 3341, 2926, 1637, 1600, 1413 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.51–8.46 (2 H, m), 8.24–8.18 (4 H, m), 7.95 (1 H, s), 7.89–7.86 (2 H, m), 7.73 (1 H, d, *J* = 5.68), 7.67–7.61 (2 H, m) LC/MS-MS 280.19 (M+H⁺).

N-Phenyl-4-(pyridin-3-yl)benzamide (19). Yield 29 %. mp 222 °C IR 3240, 2924, 1674, 1597, 1533, 1438, 1317 ¹H-NMR (d₆-DMSO) 10.31 (1 H, s), 8.99 (1 H, s), 8.62 (1 H, dd, *J* = 4.73), 8.19 (1 H, dt, *J* = 7.88), 8.10 (2 H, d, *J* = 8.20), 7.91 (2 H, d, *J* = 8.20), 7.81 (2 H, d, *J* = 7.57), 7.55–7.52 (1 H, m), 7.36 (2 H, t, *J* = 7.25), 7.11 (1 H, t, *J* = 7.25) ¹³C-NMR (d₆-DMSO) 164.96, 149.04, 147.78, 139.97, 139.09, 134.55, 134.33, 128.56, 128.43, 126.77, 123.91, 123.67, 120.36 LC/MS-MS 275.15 (M+H⁺).

N-Phenyl-4-(pyridin-4-yl)benzamide (20). Yield 23 %. mp 225 °C IR 3305, 2925, 2443, 1632, 1595, 1494, 1412, 1316 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.12 (2 H, d, *J* = 5.99), 7.57 (2 H, d, *J* = 8.20), 7.36 (2 H, d, *J* = 8.51), 7.25–7.23 (2 H, m), 7.19 (2 H, d, *J* = 7.57), 6.87 (2 H, m), 7.67–6.64 (1 H, m) ¹³C-NMR (CDCl₃) 166.22, 148.91, 147.71, 140.20, 137.79, 135.16, 128.03, 127.77, 126.45, 123.97, 121.47, 120.57 LC/MS-MS 272.91 (M-H⁺).

N-Phenyl-4-(pyrimidin-5-yl)benzamide (21). Yield 49 %. mp 220 °C IR 3316, 2361, 1677, 1599, 1538, 1400, 1326 ¹H-NMR (CDCl₃) 9.19 (1 H, s), 8.96 (2 H, s), 8.02 (2 H, d, *J* = 8.20), 7.68–7.64 (4 H, m), 7.34 (2 H, m), 7.15–7.11 (1 H, m), 7.89 (1 H, dt, *J* = 7.92), 7.72–7.68 (3 H, m), 7.47 (1 H, t, *J* = 7.92), 7.37–7.34 (2 H, m) ¹³C-NMR (CDCl₃) 165.36, 157.66, 154.94, 137.84, 137.18, 135.53, 133.51, 129.01, 128.40, 127.14, 124.75, 120.52 LC/MS-MS 273.96 (M-H⁺).

N-Benzyl-4-(thiophen-3-yl)benzamide (22). Yield 62 %. mp 180 °C IR 3346, 2928, 1635, 1521, 1278 ¹H-NMR (CDCl₃) 7.82 (2 H, d, *J* = 8.83), 7.65 (2 H, d, *J* = 8.51), 7.53 (1 H, t, *J* = 2.21), 7.42 (2 H, d, *J* = 2.21), 7.38–7.37 (4 H, m), 7.33–7.29 (1 H, m), 4.67 (2 H, d, *J* = 5.68) ¹³C-NMR (CDCl₃) 166.89, 141.17, 138.88, 138.20, 132.75, 128.81, 127.95, 127.65, 127.57, 127.64, 126.64, 126.15, 121.53, 44.18 LC/MS-MS 294.11 (M+H⁺).

N-Benzyl-4-(pyridin-3-yl)benzamide (23). Yield 50 %. mp 108 °C IR 3324, 2925, 2359, 1636, 1541, 1313, 1260, 1027 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.69 (1 H, s), 8.48 (1 H, dd, *J* = 5.04), 7.82 (2 H, d, *J* = 8.20), 7.77 (1 H, dt, *J* = 7.88), 7.50 (2 H, d, *J* = 8.83), 7.29–7.23 (4 H, m), 7.21–7.18 (1 H, m), 6.94–6.92 (1 H, m), 4.57 (2 H, d, *J* = 5.68) ¹³C-NMR (CDCl₃) 165.89, 148.03, 147.20, 139.78, 137.23, 134.52, 133.38, 127.74, 126.87, 126.56, 126.17, 122.63, 43.12 LC/MS-MS 289.22 (M+H⁺).

N-Benzyl-4-(quinolin-3-yl)benzamide (24). Yield 51 %. mp 190 °C IR 3280, 3306, 2926, 2430, 1625, 1551, 1437, 1303 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.63 (1 H, s), 8.47 (1 H, s), 8.07 (1 H, s), 7.57–7.50 (4 H, m), 7.37 (2 H, d, *J* = 8.51), 7.15–7.08 (3 H, m), 7.03–7.00 (2 H, m), 6.87–6.85 (2 H, m), 4.10 (2 H, s) LC/MS-MS 339.26 (M+H⁺).

N-Benzyl-4-(pyrimidin-5-yl)benzamide (25). Yield 90 %. mp 171 °C IR 3314, 3056, 2229, 1641, 1533, 1418, 1313 ¹H-NMR (CDCl₃) 9.23 (1 H, s), 8.96 (2 H, s), 7.94 (2 H, d, *J* = 8.51), 7.64 (2 H, d, *J* = 8.51), 7.38–7.30 (5 H, m), 6.55 (1 H, s), 4.67 (2 H, d, *J* = 5.68) ¹³C-NMR (CDCl₃) 166.46, 158.03, 154.94, 137.96, 137.35, 134.85, 133.34, 128.87, 128.13, 127.97, 127.78, 127.18, 44.30 LC/MS-MS 290.19 (M+H⁺).

N-Benzyl-2-hydroxy-5-(pyridin-3-yl)benzamide (26). Yield 11 %. IR 3349, 2926, 1732, 1642, 1543, 1474, 1290, 1230 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.81 (1 H, s), 8.51 (1 H, s), 7.84 (1 H, s), 7.66 (1 H, s), 7.55 (1 H, d, *J* = 8.51), 7.37–7.29 (7 H, m), 7.08 (2 H, d, *J* = 8.51), 4.66 (2 H, d, *J* = 5.68) LC/MS-MS 303.19 (M-H⁺).

N-(Furan-2-ylmethyl)-4-(pyridin-3-yl)benzamide (27). Yield 23 %. mp 137 °C IR 3313, 2934, 1630, 1544, 1310, 1190, 1154 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.84 (1 H, s), 8.61 (1 H, s), 7.91–7.86 (3 H, m), 7.63 (2 H, d, *J* = 8.51), 7.40–7.37 (2 H, m), 6.61 (1 H, s), 6.36–6.31 (2 H, m), 4.66 (2 H, d, *J* = 5.36) ¹³C-NMR (CDCl₃) 166.31, 151.10, 149.12, 148.28, 142.36, 141.01, 135.54, 134.42, 133.75, 127.85, 127.27, 123.64, 110.56, 107.80, 37.09 LC/MS-MS 279.21 (M+H⁺).

N-(Furan-2-ylmethyl)-4-(quinolin-3-yl)benzamide (28). Yield 76 %. mp 176 °C IR 2962, 1728, 1649, 1546, 1495, 1377, 1272, 1122, 1073 ¹H-NMR (CDCl₃) 9.10 (1 H, s), 8.25 (1 H, s), 8.07 (1 H, d, *J* = 8.20), 7.87 (2 H, d, *J* = 8.51), 7.81 (1 H, d, *J* = 8.20), 7.71–7.64 (3 H, m), 7.54–7.51 (1 H, m), 7.32 (1 H, s), 6.53 (1 H, s), 6.29–6.26 (2 H, m), 4.61 (2 H, d, *J* = 5.36) ¹³C-NMR (CDCl₃) 166.24, 151.10, 149.49, 147.66, 142.38, 141.10, 133.68, 133.61, 129.83, 129.30, 128.84, 128.09, 127.87, 127.93, 127.53, 127.24, 110.57, 107.81, 37.11 LC/MS-MS 329.04 (M+H⁺).

N-(Furan-2-ylmethyl)-4-(pyridin-4-yl)benzamide (29). Yield 77 %. mp 158 °C IR 3254, 1635, 1596, 1554, 1486, 1414, 1315, 1189, 1070 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.66–8.65 (2 H, m), 7.90 (2 H, d, *J* = 8.51), 7.56 (2 H, d, *J* = 8.83), 7.50–7.48 (2 H, m), 7.37–7.36 (1 H, m), 6.82 (1 H, s), 6.34–6.33 (1 H, m), 6.30–6.29 (1 H, m), 4.65 (2 H, d, *J* = 5.36) ¹³C-NMR (CDCl₃) 166.55, 151.11, 150.34, 147.21, 142.32, 141.18, 134.66, 132.10, 128.55, 128.46, 127.91, 127.17, 121.63, 110.54, 107.78, 37.08 LC/MS-MS 279.21 (M+H⁺).

N-(Furan-2-ylmethyl)-4-(pyrimidin-5-yl)benzamide (30). Yield 73 %. mp 165 °C IR 3343, 1634, 1544, 1415, 1307, 1190 ¹H-NMR (CDCl₃) 9.14 (1 H, s), 8.87 (2 H, s), 7.87 (2 H, d, *J* = 8.51), 7.55 (2 H, d, *J* = 8.51), 7.30–7.29 (1 H, m), 6.72 (1 H, s), 6.28–6.27 (1 H, m), 6.26–6.24 (1 H, m), 4.59 (2 H, d, *J* = 5.36) ¹³C-NMR (CDCl₃) 166.37, 157.99, 154.91, 151.02, 142.36, 137.34, 134.68, 133.32, 128.20, 127.11, 110.57, 107.84, 37.11 LC/MS-MS 280.12 (M+H⁺).

N-(4-Methoxyphenyl)-4-(pyridin-4-yl)benzamide (31). Yield 26 %. IR 2987, 1715, 1598, 1515, 1453, 1402, 1365, 1249, 1182, 1026 ¹H-NMR (CDCl₃) 9.16 (1 H, s), 8.89 (2 H, s), 8.12 (2 H, d, *J* = 8.53), 7.56 (2 H, d, *J* = 8.54), 7.32 (2 H, d, *J* = 8.69), 6.84 (2 H, d, *J* = 8.70), 3.74 (3 H, s) ¹³C-NMR (CDCl₃) 167.35, 156.56, 153.45, 150.07, 135.30, 134.71, 131.58, 130.62, 129.47, 123.17, 121.48, 114.35, 55.44 LC/MS-MS 306.01 (M+H⁺).

N-(4-Methoxyphenyl)-4-(pyrimidin-5-yl)benzamide (32). Yield 22 %. IR 3046, 1645, 1514, 1410, 1325, 1246, 1175, 1118 ¹H-NMR (CDCl₃) 9.26 (1 H, s), 9.00 (2 H, s), 8.03 (2 H, d, *J* = 8.06), 7.76 (1 H, s), 7.71 (2 H, d, *J* = 8.17), 7.57 (2 H, d, *J* = 8.48), 6.94 (2 H, d, *J* = 8.86), 3.83 (3 H, s) ¹³C-NMR (CDCl₃) 167.35, 161.21, 156.48, 155.84, 137.86, 135.35, 134.54, 131.71, 130.69, 128.05, 121.25, 114.37, 55.43 LC/MS-MS 306.27 (M+H⁺).

N-(4-methoxybenzyl)-4-(pyridin-4-yl)benzamide (33). Yield 19 %. mp 174 °C IR 3298, 1635, 1594, 1556, 1511, 1414, 1316, 1242, 1174, 1033 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.75 (2 H, d, *J* = 5.67), 7.89 (2 H, d, *J* = 8.13), 7.91 (2 H, d, *J* = 5.63), 7.76 (2 H, d, *J* = 7.63), 7.29 (2 H, d, *J* = 8.33), 6.88 (2 H, d, *J* = 8.53), 6.43 (1 H, s), 4.60 (2 H, d, *J* = 5.55), 3.79 (3 H, s) ¹³C-NMR (CDCl₃) 166.58, 160.28, 153.34, 150.11, 135.41, 132.57, 130.18, 129.86, 128.68, 123.07, 113.88, 55.14, 44.20 LC/MS-MS 319.58 (M+H⁺).

N-(3-(Thiophen-3-yl)phenyl)-4-(pyridin-3-yl)benzamide (34). Yield 24 %. mp 175 °C IR 3270, 2924, 1650, 1601, 1480, 1304 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.81 (1 H, s), 8.58 (1 H, s), 7.95–7.93 (3 H, m), 7.90 (1 H, s), 7.85 (1 H, dt, *J* = 7.88), 7.63 (2 H, d, *J* = 8.51), 7.53–7.50 (1 H, m), 7.43–7.42 (1 H, m), 7.34–7.31 (3 H, m), 7.19 (1 H, s) ¹³C-NMR (CDCl₃) 165.17, 149.24, 148.30, 141.79, 141.31, 138.35, 136.89, 134.46, 129.55, 127.88, 127.50, 126.33, 126.28, 123.70, 122.81, 120.80, 118.90, 118.27 LC/MS-MS 357.24 (M+H⁺).

N-(3-(Pyridin-3-yl)phenyl)-4-(pyridin-3-yl)benzamide (35). Yield 3 %. mp 70 °C IR 2963, 1655, 1594, 1545, 1425, 1260 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.90–8.88 (2 H, m), 8.67–8.65 (1 H, m), 8.62–8.61 (1 H, m), 8.05–7.99 (4 H, m), 7.94–7.92 (2 H, m), 7.72 (2 H, d, *J* = 8.51), 7.69–7.67 (1 H, m), 7.51 (1 H, t, *J* = 7.88), 7.43–7.38 (3 H, m) LC/MS-MS 350.91 (M-H⁺).

N-(3-(Pyridin-3-yl)phenyl)-4-(pyridin-4-yl)benzamide (36). Yield 6 %. IR 3265, 3039, 1665, 1595, 1547, 1471, 1401, 1295, 1259 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.88 (1 H, s), 8.72–8.71 (2 H, m), 8.61–8.60 (1 H, m), 8.24 (1 H, s), 8.04 (2 H, d, *J* = 8.51), 8.00 (1 H, s), 7.94–7.92 (1 H, m), 7.76 (2 H, d, *J* = 8.83), 7.70 (1 H, s), 7.55–7.54 (2 H, m), 7.50 (1 H, t, *J* = 7.88), 7.40–7.37 (2 H, m) LC/MS-MS 349.98 (M-H⁺).

N-(3-(Pyridin-3-yl)phenyl)-4-(pyrimidin-5-yl)benzamide (37). Yield 24 %. mp 155 °C IR 3287, 3045, 1677, 1597, 1554, 1399, 1294 ¹H-NMR (CDCl₃) 9.24 (1 H, s), 8.96 (2 H, s), 8.84 (1 H, s), 8.57–8.53 (2 H, m), 8.07 (2 H, d, *J* = 8.53), 7.97 (1 H, s), 7.89 (1 H, dt, *J* = 7.92), 7.72–7.68 (3 H, m), 7.47 (1 H, t, *J* = 7.92), 7.37–7.34 (2 H, m) ¹³C-NMR (CDCl₃) 165.20, 158.09, 154.95, 148.63, 148.16, 138.78, 138.69, 137.69, 136.21, 135.24, 134.57, 129.87, 128.36, 127.31, 123.65, 123.46, 120.04, 119.11 LC/MS-MS 353.25 (M+H⁺).

4-(Thiophen-3-yl)benzoic acid (38). Yield 94 %. mp 280 °C (Lit. 281–282 °C)⁹ ¹H-NMR (d₆-DMSO) 8.05–8.04 (1 H, m), 7.96 (2 H, d, *J* = 8.51), 7.85 (2 H, d, *J* = 8.20), 7.63–7.68 (1 H, m), 7.64–7.63 (1 H, m). ¹³C-NMR (d₆-DMSO) 167.02, 140.31, 139.09, 129.92, 129.07, 127.46, 126.14, 125.99, 122.79.

4-(Pyridin-3-yl)benzoic acid (39). Yield 62 %. mp 215 °C (Lit. 215 °C)¹⁰ ¹H-NMR (D₂O/TFA) 7.80 (1 H, s), 7.61–7.56 (2 H, m), 7.00 (2 H, d, *J* = 8.51), 6.96–6.93 (1 H, m), 6.56 (2 H, d, *J* = 8.51).

4-(Chinolin-3-yl)benzoic acid (40). Yield 92 %. ¹H-NMR (d₆-DMSO/TFA : 1/0.1) 9.66 (1 H, s), 9.51 (1 H, s), 7.80–7.78 (1 H, m), 8.38 (1 H, d, *J* = 7.88), 8.27 (1 H, d, *J* = 8.51), 8.15–8.08 (5 H, m), 7.98–7.95 (1 H, m) (Lit. 250 MHz, d₆-DMSO: 13.09 (1 H, br s), 9.32 (1 H, d), 8.76 (1 H, d), 8.07 (5 H, m), 7.83 (2 H, m), 7.67 (1 H, m))¹¹ ¹³C-NMR (d₆-DMSO + TFA) 166.79, 144.39, 132.64, 131.15, 130.18, 127.61, 129.76, 129.47, 118.44, 116.15, 113.85, 111.56.

5-(Pyridin-3-yl)salicylic acid (41). Yield 46 %. mp 260 °C (Lit. 263 °C)¹² ¹H-NMR (D₂O/TFA : 1/1) 7.61 (1 H, s), 7.42–7.40 (1 H, m), 7.36–7.35 (1 H, m), 6.93 (1 H, d, *J* = 2.52), 6.78–6.75 (1 H, m), 6.49 (1 H, dd, *J* = 8.51), 5.84 (1 H, d, *J* = 8.83) ¹³C-NMR had no expressiveness because of the TFA.

4-(Pyrimidin-5-yl)benzoic acid (42). Yield 60 %. mp 218 °C (Lit. 220 °C)¹³ ¹H-NMR (d₆-DMSO) 9.17 (1 H, s), 9.15 (2 H, s), 8.01 (2 H, d, *J* = 8.20), 7.74 (2 H, d, *J* = 8.20) ¹³C-NMR (d₆-DMSO) 169.60, 157.11, 154.60, 140.35, 133.92, 133.18, 131.47, 131.39, 129.85, 128.75, 125.81.

4-(Pyridin-4-yl)benzoic acid (43). Yield 98 %. mp 208 °C (Lit. 210 °C)¹⁴ Because of the insolubility of the product it was impossible to measure NMR. Further reactions showed it to be the desired product.

3-(Thiophen-3-yl)aniline (44). Yield 82 %. mp 85 °C (Lit. 86–88 °C)¹⁵ ¹H-NMR (CDCl₃) 7.44–7.43 (1 H, m), 7.40–7.39 (2 H, m), 7.22 (1 H, t, *J* = 7.88), 7.07–7.05 (1 H, m), 6.94–6.93 (1 H, m), 6.66–6.64 (1 H, m) ¹³C-NMR (CDCl₃) 146.89, 142.58, 136.96, 129.81, 126.51, 126.04, 120.28, 117.04, 114.12, 113.21.

3-(Pyridin-3-yl)aniline (45). Yield 54 %. mp 75 °C (Lit. 72–74 °C)¹⁶ ¹H-NMR (CDCl₃) 8.80 (1 H, s), 8.54 (1 H, s), 7.80–7.78 (1 H, m), 7.30–7.28 (1 H, m), 7.23–7.22 (1 H, m), 6.93–6.91 (1 H, m), 6.83 (1 H, s), 6.69–6.67 (1 H, m) ¹³C-NMR (CDCl₃) 148.33, 134.28, 132.11, 132.03, 131.93, 129.98, 128.46, 123.44, 117.30, 114.78, 113.57.

4-(Chinolin-3-yl)benzyl alcohol (46). Yield 48 %. ¹H-NMR (CDCl₃) 9.06 (1 H, s), 8.28 (1 H, s), 8.12 (1 H, d, *J* = 8.53), 7.87–7.85 (1 H, m), 7.73–7.67 (3 H, m), 7.58–7.55 (1 H, m), 7.50 (2 H, d, *J* = 8.53), 7.24 (1 H, s), 4.77 (2 H, s) (Lit. d₆-DMSO: 8.88 (1 H, d, *J* = 2.00), 8.56 (1 H, dd, *J* = 5, 20), 8.07 (1 H, dt, *J* = 8, 20), 7.68 (2 H, d, *J* = 8.00), 7.48 (1 H, dd, *J* = 8, 50), 7.44 (2 H, d, *J* = 8.00), 5.25 (1 H, t, *J* = 6.00), 4.55 (2 H, d, *J* = 6.00))¹⁷ ¹³C-NMR (CDCl₃) 149.82, 147.27, 142.30, 141.03, 140.36, 140.31, 137.16, 133.52, 133.19, 129.46, 129.16, 127.99, 127.81, 127.56, 127.05, 64.31.

References

1. Pawlowsky, J.M. and J.G. McHutchison, Hepatitis C. Development of new drugs and clinical trials: promises and pitfalls. Summary of an AASLD hepatitis single topic conference, Chicago, IL, February 27-March 1, 2003. *Hepatology*, 2004. 39, 554-67.
2. Chisari, F.V., Unscrambling hepatitis C virus-host interactions. *Nature*, 2005. 436, 930-2.
3. Kitadokoro, K., M. Ponassi, G. Galli, R. Petracca, F. Falugi, G. Grandi, and M. Bolognesi, Subunit association and conformational flexibility in the head subdomain of human CD81 large extracellular loop. *Biol Chem*, 2002. 383, 1447-52.
4. VanCompernelle, S.E., A.V. Wiznycia, J.R. Rush, M. Dhanasekaran, P.W. Baures, and S.C. Todd, Small molecule inhibition of hepatitis C virus E2 binding to CD81. *Virology*, 2003. 314, 371-80.
5. Neugebauer, A., R.W. Hartmann, and C.D. Klein, Prediction of protein-protein interaction inhibitors by chemoinformatics and machine learning methods. *J Med Chem*, 2007. 50, 4665-8.
6. Drummer, H.E., K.A. Wilson, and P. Pountourios, Identification of the hepatitis C virus E2 glycoprotein binding site on the large extracellular loop of CD81. *J Virol*, 2002. 76, 11143-7.
7. Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A.J. Weiner, M. Houghton, D. Rosa, G. Grandi, and S. Abrignani, Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, 1998. 282, 938-41.

8. Ziegler, S., Kronenberger B., Albrecht B., Kaul A., Gamer A.-L., Klein C. D., Hartmann R. W., Development and Evaluation of a FACS-Based Medium Throughput Assay for HCV Entry Inhibitors. *J. Biomol. Scr.*, 2009. soon to be published
9. Francesco, F., M. Gianlorenzo, and T. Aldo, *J Chem Soc B: Phys Org*, 1970. 8, 1595-71.
10. Guiles, R.D., S. Sarma, R.J. DiGate, D. Banville, V.J. Basus, I.D. Kuntz, and L. Waskell, Pseudocontact shifts used in the restraint of the solution structures of electron transfer complexes. *Nat Struct Biol*, 1996. 3, 333-9.
11. Gaster, L. M., (Smithkline Beecham) *GB Patent WO9850358*. 1998.
12. Sarett, L. H., Ruyle, W. C., (Merck & Co. Inc.) *DE Patent 1801303*. 1967.
13. Gong, Y., Pauls, H. W., *Syn. Lett.* 2000, 6, 829-31.
14. Ciba Ltd., *NL Patent 6414307*. 1964.
15. Coates, W. J., Rawlings, A. D., (Smithkline Beecham) *GB Patent WO9429277*. 1994.
16. Carabateas, P. M., Brundage, P. R., Gelotte, K. O., Gruett, M. D., Lorenz, R. R., *J. Heterocycl. Chem.* 1984, 21, 1849-56.
17. Baxendale, I.R., C.M. Griffiths-Jones, S.V. Ley, and G.K. Tranmer, Microwave-assisted Suzuki coupling reactions with an encapsulated palladium catalyst for batch and continuous-flow transformations. *Chemistry*, 2006. 12, 4407-16.

4.3. Identifikation of terfenadine as an inhibitor of human CD81-receptor HCV-E2 interaction: Synthesis and structure optimization

Marcel Holzer, Sigrid Ziegler, Beatrice Albrecht, Bernd Kronenberger, Artur Kaul, Ralf Bartenschlager, Lars Kattner, Christian D. Klein and Rolf W. Hartmann

This manuscript has been published as an article in
Molecules **2008**, *13*, 1081-1110

Publication III.

Abstract

Terfenadine was identified in a biological screening to be a moderate inhibitor (27 % inhibition) of the CD81-LEL–HCV-E2 interaction. To increase the observed biological activity, 63 terfenadine derivatives were synthesized via microwave assisted nucleophilic substitution. The prepared compounds were tested for their inhibitory potency by means of a fluorescence labeled antibody assay using Huh-7.5 cells. Distinct structure-activity relationships could be derived. Optimization was successful, leading to **3g**, identified as the most potent compound (69 % inhibition). Experiments with viral particles revealed that there might be additional HCV infection reducing mechanisms.

Introduction

Despite the discovery of the Hepatitis C Virus (HCV) more than 15 years ago, chronic HCV infection is still incurable in many patients, leading to cirrhosis, end-stage liver disease and hepatocellular carcinoma.¹ According to the 2002 WHO report, in 2001 more than 280,000 deaths worldwide were attributable to HCV infection.² The *large extracellular loop* (LEL) of the human CD81 cell surface protein, a member of the tetraspanin family, was identified as a binding partner for the Hepatitis C Virus envelope glycoprotein E2 (HCV-E2).³ Since inhibition of this interaction prevents HCV from infecting hepatocytes, the HCV principal target cells,³ the aim of the present work was to prepare compounds which restrain the CD81-LEL–HCV-E2 interaction by binding to the LEL. Another approach to inhibit this interaction using compounds that bind to the E2 glycoprotein of HCV was recently published by VanCompernelle et al.³

Results and discussion

Biological screening. The starting point of this work was a biological screening of natural products, current drugs and our in-house substance library (approximately 350 compounds, including several structurally different antihistamines) using a medium throughput assay developed in our group.⁴ This assay is based on a procedure developed by Pileri et al.,⁵ in which the compounds inhibit the binding of the fluorescence-labeled CD81 antibody JS81 to Huh-7.5 cells.

As an outcome of this screening an antihistamine, terfenadine (figure 1), was found to be a moderate inhibitor of the CD81-LEL-HCV-E2 interaction (27 % at 50 μ M), whereas all other antihistamines showed no biological activity.

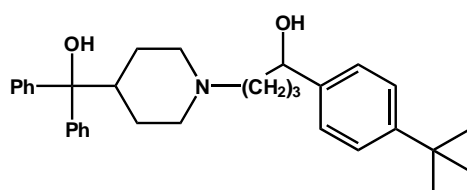
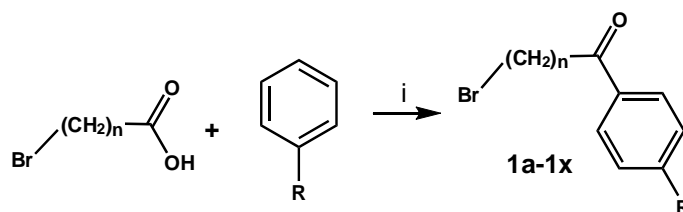


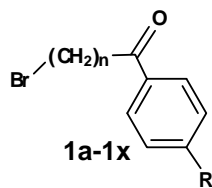
Figure 1. Terfenadine.

Structure Modification. Based on these results, a series of terfenadine derivatives was prepared seeking to increase the inhibitory activity and to derive structure-activity relationships. The following structural features were modified: length of the alkyl “linker” between the piperidine and the phenyl moiety, alkyl substituent on the phenyl ring, secondary hydroxy group and the azacyclonol moiety.

Syntheses. The first step of the preparation was a Friedel-Crafts (FC) acylation of the benzene derivative with aluminium chloride as catalyst and the carboxylic acid chloride of the corresponding ω -bromo-carboxylic acid, prepared using thionyl chloride (scheme 1). The synthesized 1-aryl- ω -bromo ketones are shown in table 1.



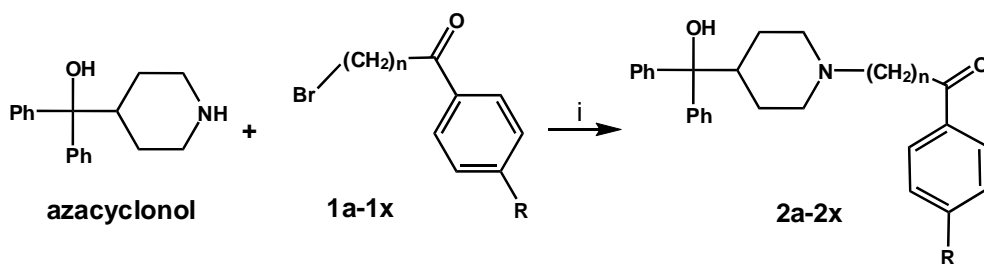
Scheme 1. Reagents and conditions for the FC acylation and synthesized 1-aryl- ω -bromo ketones: (i) 1. SOCl_2 , rt, 30 min 2. dry CH_2Cl_2 , AlCl_3 , 0 $^\circ\text{C}$, 45 min ($n = 3-5$; $\text{R} = \text{H}$; $\text{C}_1\text{-C}_4$).



R	n	compound	n	compound	n	compound
H	5	1a	4	1i	3	1q
Methyl	5	1b	4	1j	3	1r
Ethyl	5	1c	4	1k	3	1s
<i>n</i> -Propyl	5	1d	4	1l	3	1t
<i>iso</i> -Propyl	5	1e	4	1m	3	1u
<i>n</i> -Butyl	5	1f	4	1n	3	1v
<i>iso</i> -Butyl	5	1g	4	1o	3	1w
<i>tert</i> -Butyl	5	1h	4	1p	3	1x

Table 1. Synthesized 1-aryl- ω -bromo ketones 1a-1x ($n = 3-5$; $R = H$; C_1-C_4).

In the second reaction step (scheme 2) the precursors 1a-1x were coupled to azacyclonol according to a described procedure.⁶ The classical nucleophilic substitution was optimized for microwave assisted synthesis. The desired compounds were obtained in satisfying yields in a very short time (5-45 minutes). This led to compounds 2a-2x, shown in table 2.



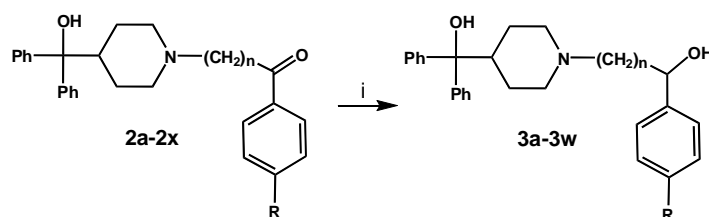
Scheme 2. Reagents and conditions: (i) K_2CO_3 , catalytic KI and 18-crown-6, dry acetonitrile, microwave: 150 Watt, 6.5 bar, 175 °C, 45 min (100 Watt, 140 °C, 3 h: 2g, 2h, 2t, 2u, 2v, 2w), $n = 3-5$; $R = H$; C_1-C_4 .



R	n	com- pound	n	com- pound	n	com- pound	n	com- pound	n	com- pound	n	com- pound
H	5	2a	4	2i	3	2q	5	3a	4	3i	3	3q
Methyl	5	2b	4	2j	3	2r	5	3b	4	3j	3	3r
Ethyl	5	2c	4	2k	3	2s	5	3c	4	3k	3	3s
<i>n</i> -Propyl	5	2d	4	2l	3	2t	5	3d	4	3l	3	3t
<i>iso</i> -Propyl	5	2e	4	2m	3	2u	5	3e	4	3m	3	3u
<i>n</i> -Butyl	5	2f	4	2n	3	2v	5	3f	4	3n	3	3v
<i>iso</i> -Butyl	5	2g	4	2o	3	2w	5	3g	4	3o	3	3w
<i>tert</i> -Butyl	5	2h	4	2p	3	2x	5	3h	4	3p	3	terfenadine

Table 2. Synthesized terfenadine derivatives 2a-2x and 3a-3w ($n = 3-5$; $R = H$; C_1-C_4).

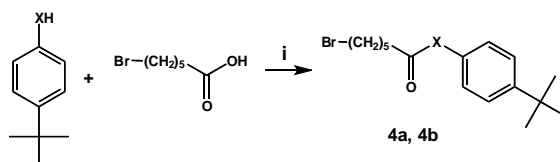
A sodium borohydride reduction (scheme 3) of the ketone function followed. The prepared alcohols 3a-3w, which were obtained as racemates, are also listed in table 2.



Scheme 3. Reagents and conditions: (i) NaBH_4 , MeOH, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h ($n = 3-5$; $R = H$; C_1-C_4).

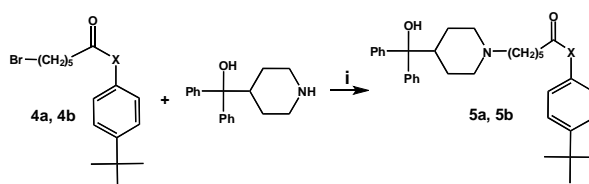
Since azacyclonol, the second component for the coupling reaction, was commercially available, this synthetic procedure facilitated the preparation of a large variety of compounds in a minimum amount of time. For further modification of the secondary hydroxyl group the ester 5a, the amide 5b and the alkane 8a were synthesized.

Activation of 6-bromo hexanoic acid with thionyl chloride followed by addition of commercially available 4-*tert*-butyl phenol and 4-*tert*-butyl aniline, respectively, led to the ω -bromo substituted precursors 4a and 4b (scheme 4).



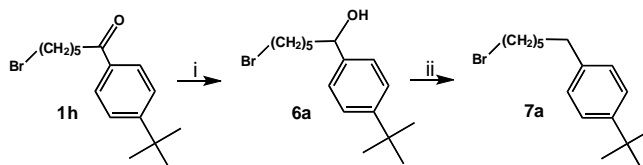
Scheme 4. Reagents and conditions: (i) 1. SOCl₂, rt, 1 h 2. NEt₃, dry CH₂Cl₂, 0 °C 30 min, rt 1 h (X = -O-: 4a, X = -NH-: 4b).

Next, these precursors were nucleophilically coupled to azacyclonol, leading to compounds 5a and 5b, respectively (scheme 5).

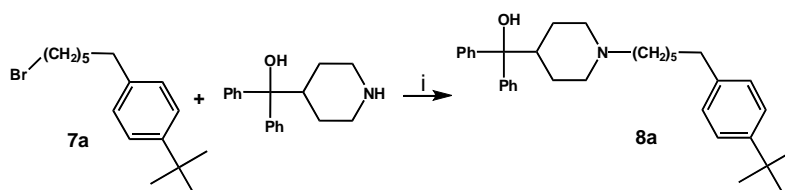


Scheme 5. Reagents and conditions: (i) K₂CO₃, catalytic KI and 18-crown-6, dry acetonitrile, 150 Watt, 140 °C, 1 h (X = -O-: 5a, X = -NH-: 5b).

For the synthesis of 8a compound 1h was reduced using sodium borohydride. The resulting alcohol 6a was converted into the corresponding alkane 7a by means of a mixture of indium(III) chloride and chlorodiphenylsilane (scheme 6) and subsequently coupled to azacyclonol, leading to compound 8a (scheme 7).

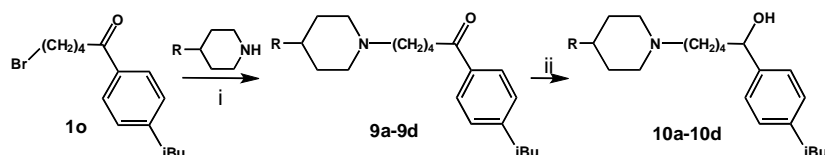


Scheme 6. Reagents and conditions: (i) see Scheme 3; (ii) indium(III) chloride, chlorodiphenylsilane, dry dichloromethane, 3 h, rt.



Scheme 7. Reagents and conditions: (i) K₂CO₃, catalytic KI and 18-crown-6, dry acetonitrile, 50 Watt, 100 °C, 5 min.

The exchange of the azacyclonol component by smaller piperidine moieties started from the 1-aryl- ω -bromo ketone 1o and was accomplished via microwave assisted nucleophilic substitution, followed by reduction of the ketone (scheme 8). The prepared compounds 9a-9d, as well as the corresponding alcohols 10a-10d, obtained as racemates, are shown in table 3.



Scheme 8. Reagents and conditions: (i) K_2CO_3 , catalytic KI and 18-crown-6, dry acetonitrile, microwave 150 Watt, 6.5 bar, 175 °C, 45 min; (ii) $NaBH_4$, MeOH, 0 °C, 1 h (R = -H, -CH₃, -OH, benzyl).

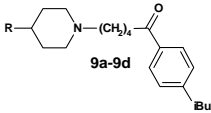
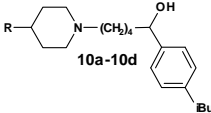
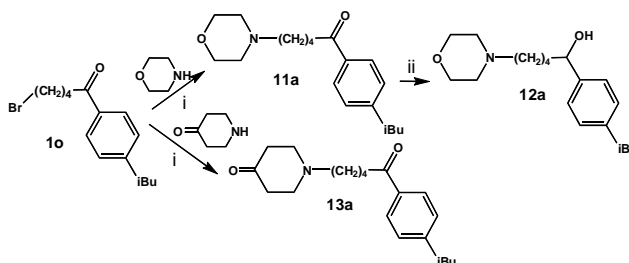
 9a-9d		 10a-10d	
R	compound	R	compound
H	9a	H	10a
Methyl	9b	Methyl	10b
Hydroxyl	9c	Hydroxyl	10c
Benzyl	9d	Benzyl	10d

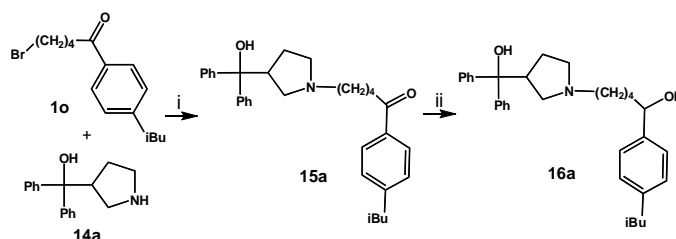
Table 3. Synthesized terfenadine derivatives 9a-9d and 10a-10d.

Furthermore, **1o** was reacted with morpholine and piperidin-4-one resulting in compounds **11a**, **12a** and **13a** (scheme 9). The morpholine derivative **12a** was obtained as a racemate.



Scheme 9. Reagents and conditions: (i) K_2CO_3 , catalytic KI and 18-crown-6, dry acetonitrile, microwave 150 Watt, 6.5 bar, 175 °C, 45 min; (ii) $NaBH_4$, MeOH, 0 °C, 1 h.

For the syntheses of the pyrrolidine compounds **15a** and **16a**, **1o** was coupled with diphenyl(pyrrolidin-3-yl)methanol (**14a**). The resulting ketone **15a** was reduced with sodium borohydride (scheme 10), leading to the desired compound as a racemate.

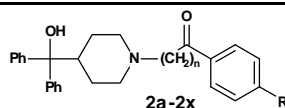


Scheme 10. Reagents and conditions: (i) K_2CO_3 , catalytic KI and 18-crown-6, dry acetonitrile, microwave 150 Watt, 6.5 bar, 175 °C, 45 min; (ii) $NaBH_4$, MeOH, 0 °C, 1 h.

Biological evaluation. The synthesized terfenadine derivatives were tested for their inhibitory potency using the antibody neutralization (AN) assay mentioned above (tables 4-8).⁴ In this assay the potential inhibitors and the fluorescence-labeled antibody JS81 compete for binding to the LEL on the CD81 receptor molecule. The reduction of the interaction of JS81 with CD81 on Huh-7.5 cells caused by the compounds decreases fluorescence which is measured by FACS in comparison to untreated control cells.

The % inhibition values of compounds **2a-2x** (table 4) and **3a-3w** (table 5) show that the alkyl substituent R on the phenyl ring has a major influence on the activity. Another important feature is obviously the length of the linker, whereas the activities of the ketones (table 4) and the corresponding alcohols (table 5) do not differ significantly, at least in case of the *n*-propyl and *n*-butyl compounds.

Increasing the size of R from hydrogen to bulkier alkyl substituents increases inhibition. A maximum inhibition, not depending on the linker length, could be reached by the use of *n*-propyl for the ketones and *iso*-butyl for the alcohols, with the exception of compounds **2d** and **3w**, which are less active than the analogous **2e** and **3v**. Generally, compounds with *n* = 3 show a lower inhibition than those with *n* = 4 or 5, with the exception of **3v**, which is more active than **3f** and **3n**. Furthermore, reduction of the ketones **2a-2x** to the corresponding alcohols **3a-3w** and terfenadine led to a decreased activity for compounds with small substituents at the phenyl ring, whereas a reduction of bulky substituted compounds led to derivatives with comparable inhibition.



R	n = 5		n = 4		n = 3	
	compound	inhibition (%)	compound	inhibition (%)	compound	inhibition (%)
H	2a	10	2i	4	2q	7
Methyl	2b	12	2j	8	2r	7
Ethyl	2c	42	2k	24	2s	1
<i>n</i> -Propyl	2d	59	2l	64	2t	57
<i>iso</i> -Propyl	2e	63	2m	29	2u	41
<i>n</i> -Butyl	2f	56	2n	57	2v	56
<i>iso</i> -Butyl	2g	46	2o	60	2w	44
<i>tert</i> -Butyl	2h	49	2p	53	2x	37

Table 4. Inhibition of protein interaction in AN assay by compounds 2a-2x (concentration: 50 μ M, standard deviation \leq 6 %).

R	n = 5		n = 4		n = 3	
	compound	inhibition (%)	compound	inhibition (%)	compound	inhibition (%)
H	3a	4	3i	1	3q	5
Methyl	3b	8	3j	5	3r	4
Ethyl	3c	13	3k	4	3s	4
<i>n</i> -Propyl	3d	32	3l	53	3t	23
<i>iso</i> -Propyl	3e	9	3m	4	3u	11
<i>n</i> -Butyl	3f	49	3n	49	3v	64
<i>iso</i> -Butyl	3g	69	3o	67	3w	42
<i>tert</i> -Butyl	3h	58	3p	44	terfenadine	27

Table 5. Inhibition of protein interaction in AN assay by compounds 3a-3w (concentration: 50 μ M, standard deviation \leq 6 %).

The reduction of the ketones with R = *iso*-propyl to the corresponding alcohols led to a nearly complete loss of biological activity. The most active compound in this series of terfenadine derivatives is **3g** (69 % inhibition). Therefore, the hexanol linker combined with an *iso*-butyl group at the phenyl ring is the most favorable substitution pattern in this class of compounds. Replacement of the azacyclonol moiety by smaller piperidine residues (**9a-9c**, **10a-10c** and **11a-13a**) led to a loss of inhibitory activity compared to the reference compounds **2o** and **3o** (table 6). Substitution of the piperidine group by a 4-benzyl group (**9d** and **10d**) increased the inhibition to a moderate level. Again bulky substituents are essential for activity at this part of the molecule.

R	compound	inhibition (%)	compound	inhibition (%)
azacyclonol	2o	60	3o	67
	9a	7	10a	5
	9b	5	10b	7
	9c	7	10c	6
	9d	29	10d	31
	11a	8	12a	4
	13a	5		

Table 6. Inhibition of protein interaction in AN assay by compounds 9a-13a compared to compounds 2o and 3o (concentration: 50 μ M, standard deviation \leq 6 %).

Reduction of the secondary hydroxyl group of **3h** to the corresponding alkane **8a** led to a strong decrease of inhibition (table 7). Exchange of the ketone of **2h** by an ester function (compound **5a**) did not influence the inhibitory activity, whereas an amide group (compound **5b**) increased the inhibition. These SAR results indicate that the functional group X might act as an H-bond acceptor interacting with the CD81 protein.

X	compound	inhibition (%)	X	compound	inhibition (%)
	3h	58		8a	9
	2h	49		5a	48
				5b	57

Table 7. Inhibition of protein interaction in AN assay by compounds **5a-5b**, **8a** compared to compounds **2h** and **3h** (R = azacyclonol, concentration: 50 μ M, standard deviation \leq 6 %).

Exchange of the piperidine of the azacyclonol moiety of **2o** and **3o** by pyrrolidine (compounds **15a** and **16a**) did not lead to a significant change of the inhibitory activity (table 8). Obviously due to the flexibility of the chain, appropriate conformations can be found for both heterocycles.

X	compound	inhibition (%)	compound	inhibition (%)	
O	2o	60	15a	64	
OH	3o	67	16a	62	

Table 8. Inhibition of protein interaction in AN assay by compounds **15a**, **16a** compared to compounds **2p** and **3p** (R = azacyclonol, concentration: 50 μ M, standard deviation \leq 6 %).

Selected compounds with high, moderate and low inhibition in the AN assay were tested for their inhibition in an infectivity assay developed by Pietschmann and coworkers⁷ (table 9), in which Huh-7.5 cells were incubated with HCV particles of the LUC-Jc1 genome (genotype 2a)⁸ and potential inhibitors. After 48 hours, the cells were lysed and luciferase activity (a marker of infection and viral replication) was measured. The infectivity assay was performed at the highest non-cytotoxic concentrations of the compounds (0.5 μ M: **2e**, **2s**, **3f**, **3g**, **3i**, **8a** and 5 μ M: **3q**, **10d**).

Compounds with high biological activity in the neutralization assay showed good inhibition in the infectivity assay as well. This clearly indicates that inhibition of the protein-protein interaction leads to a reduction of infectivity. On the other hand there are compounds which reduced infectivity without having been active in the AN assay. One plausible reason for this phenomenon could be an interaction of these compounds with an additional target which is involved in viral infection.

Compound	Antibody neutralization assay (inhibition (%), 50 μ M)	Infectivity assay with viral particles (inhibition (%), 0.5 μ M)
2e	63	43
2s	1	19
3f	49	40
3g	69	32
3i	1	27
3q	5	33^a
8a	9	27
10d	31	45^a

Table 9. Inhibition of infectivity of viral particles by selected compounds (concentration: 0.5 μ M, ^a 5 μ M, standard deviation \leq 14 %) compared to AN assay data.

Conclusion

After having identified terfenadine as an active compound inhibiting the CD81-LEL-HCV-E2 interaction by 27 %, the compound was structurally modified with the aim of increasing the activity. The results obtained clearly demonstrate that a bulky substituent at the phenyl moiety as well as an additional bulky substituent at the other part of the molecule (like azacyclonol) are necessary for activity as well as the secondary OH-group. Another H-bond acceptor like ketone, ester or amide can replace the latter. Importantly, the activity of the parent compound can be increased by elongation of the alkyl chain resulting in **3g** with an inhibition of 69 %. A further experiment with viral particles and Huh-7.5 cells showed that there are possibly further mechanisms by which the test compounds unfold their anti-viral activity. These mechanisms remain to be elucidated.

Experimental section

General procedure. Solvents and reagents were used as received from commercial distributors without further purification. Anhydrous reactions were conducted under a

nitrogen atmosphere. Proton and carbon NMR spectra were recorded on a Bruker AM 500 instrument. The proton NMR spectra were recorded at 500 MHz, the carbon NMR spectra at 125 MHz. Chemical shifts ν are reported in ppm units. Molecular mass was determined by liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using a TSQ Quantum from Thermo Finnigan equipped with an electro spray interface and connected to a Surveyor HPLC (Thermo Finnigan). Positive and negative ion mass spectra were recorded (mass range m/z 150–1500) in normal scan mode. Melting points were determined using a Stuart Scientific SMP3 melting point apparatus. IR measurements were performed on a Bruker Vector 33 at a frequency range from 4000–250 cm^{-1} . Wave numbers ν are reported in cm^{-1} . Microwave assisted synthesis was performed using a CEM DISCOVER microwave oven or a MLS MultiSYNTH microwave oven respectively. Preparative HPLC was carried out using an Agilent Technologies, 1200 Series Isocratic, with an Agilent Prep-C18 (5 μm ; 30x100mm) preparative column using 70:30 methanol/water as eluent. Flash chromatography was performed using Merck silica gel 35/40–63/70.

Antibody neutralization assay. For the antibody neutralization assay Huh-7.5 cells were used, derived from a human hepatoma cell line which was preselected via FACS for cells displaying high amounts of CD81 on their cell surface. Cells were grown under standard conditions (Dulbecco's Modified Eagle's Medium with 10 % FCS, 1 % penicillin/streptavidin, pH 7.4, at 37 °C with 5 % CO_2). $1 \cdot 10^5$ cells were incubated with 100 μL (50 μM) of the potential inhibitor. The inhibitor solution contained 1 % DMSO, a concentration tolerated by the used Huh-7.5 cells and without influence on MFI (mean fluorescence intensity) values (data not shown). Incubation was performed in 96 transwell plates for 10 minutes at room temperature. Subsequently 4 μL of the fluorescence-labeled anti human CD81 antibody JS81 (Pharmingen) and 21 μL of phosphate buffered saline buffer (PBS) were added and kept at room temperature for 10 minutes. The final concentration of JS81 in the assay was $1.6 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. After addition of 125 μL of PBS the cell suspension was incubated in the dark for 5 hours followed by FACS (Becton Dickinson – FACS Calibur; software: Cell Quest Pro) analysis. Ten thousand vital cells out of a predetermined area were analyzed for their MFI.

Infectivity assay. *In vitro* synthesis of the LUC-Jc1 RNA genome in which the luciferase reporter gene was inserted into the genome of the Jc1 HCV variant and electroporation of Huh-7.5 cells was performed as described previously.^{9; 10} We collected culture medium containing viral particles 48 h after transfection. Huh-7.5 target cells were seeded 24 h before

infection at a density of $6 \cdot 10^5$ cells/well in a 24 well plate. Cells were infected with 200 μ L inoculum containing the potential inhibitors at 5 μ M or 0.5 μ M for 4 h. Concentrations were chosen according to the highest non-cytotoxic concentration of the given compound. Cells were washed, complete medium was added and cells were cultured for 48 h. Afterwards cells were lysed for luciferase assay as previously described.⁷

General procedure for the Friedel-Crafts acylation. The carboxylic acid was stirred with thionyl chloride (10 mL) at room temperature for 1h. After removing the excess of thionyl chloride under reduced pressure, dry dichloromethane (15 mL) and the benzene derivative (1 equivalent, referring to the carboxylic acid) were added. The solution was cooled to 0 °C and AlCl_3 (1.2 equivalents) were added. After stirring at that temperature for 45 min, the mixture was hydrolyzed, the layers separated and the water phase was extracted with dichloromethane two times. The combined organic layers were dried and the solvent removed. Flash chromatography using 1/15 ethyl acetate/n-hexane as eluent led to the desired compounds.

General procedure for the nucleophilic substitution. Azacyclonol (1 equivalent), ketone (1 equivalent), potassium carbonate (5 equivalents), a catalytic amount of potassium iodide and 18-crown-6 were stirred in dry acetonitrile (4 mL) in the microwave (CEM Discover) at 150 Watt, 6.5 bar, 175 °C for 45 min or (MultiSYNTH) at 100 Watt, 140 °C, 3 h (**2g**, **2h**, **2t**, **2u**, **2v**, **2w**) or at 50 Watt, 100 °C, 5 min (**8a**). The microwave assisted reactions were performed in a continuous air stream cooled closed vessel. Reaction temperature was monitored via an IR sensor in both microwave ovens and an additional fiber optic component in case of the MultiSYNTH. After filtering off the remaining precipitate the solvent was removed. The impurities could not be removed completely by flash chromatography (6/1 ethyl acetate/n-hexane + 3 % NEt_3), so preparative HPLC (isocratic 70/30 MeOH/ H_2O) was performed and the pure product isolated.

General procedure for the reduction of the ketones. Sodium borohydride (5 equivalents) and ketone (1 equivalent) were added to 2 mL methanol at 0 °C. After stirring for 30 min a spatula tip of sodium borohydride was added to the mixture which was stirred for another 30 min at 0 °C. The mixture was hydrolyzed using 2 mL NH_4Cl -solution. After removing the solvents under reduced pressure, the remaining solid was washed two times with methanol and ethyl acetate (2 mL each). The combined organic layers were freed from solvent and the raw product was purified by preparative HPLC (isocratic MeOH/ H_2O : 70/30) to give the racemates in satisfying yields.

General procedure for the ester and amide coupling. The carboxylic acid (1 equivalent) was stirred with an excess of thionyl chloride for 1 hour at room temperature. The resulting clear solution was freed from remaining thionyl chloride under reduced pressure. The acid chloride was dissolved in dry dichloromethane and added dropwise at 0 °C to a solution of the corresponding alcohol or amine (1.2 equivalents) and an equimolar amount of triethylamine in dry dichloromethane. After stirring for 30 minutes at 0 °C the mixture was warmed to room temperature and stirred for 1 hour. The precipitated solid was filtered off. The solvent was removed and the raw product purified by flash chromatography using an ethyl acetate/n-hexane mixture.

6-Bromo-1-phenylhexan-1-one (1a). Yield 26 %. ¹H-NMR (CDCl₃) 7.88–7.85 (2 H, m), 7.49–7.45 (1 H, m), 7.39–7.35 (2 H, m), 3.35–3.32 (2 H, m), 2.92–2.88 (2 H, m), 1.86–1.79 (2 H, m), 1.72–1.64 (2 H, m), 1.48–1.40 (2 H, m) [Lit. 400 MHz, CDCl₃: 7.94 (2 H, m), 7.55 (1 H, m), 7.45 (2 H, m), 3.41 (2 H, t, *J* = 6.80), 2.98 (2 H, t, *J* = 7.00), 1.90 (2 H, m), 1.76 (2 H, m), 1.53 (2 H, m)]¹¹ ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.96, 136.95, 133.02, 128.61, 128.02, 38.29, 33.69, 32.66, 27.89, 23.33.

6-Bromo-1-(4-methylphenyl)hexan-1-one (1b). Yield 50 %. ¹H-NMR (CDCl₃) 7.76 (2 H, d, *J* = 8.06), 7.16 (2 H, d, *J* = 7.98), 3.34–3.31 (2 H, t, *J* = 6.78), 2.88–2.84 (2 H, t, *J* = 7.44), 2.31 (3 H, s), 1.85–1.78 (2 H, m), 1.70–1.62 (2 H, m), 1.47–1.39 (2 H, m) [Lit. CDCl₃: 7.85 (2 H, d, *J* = 7.30), 7.25 (2 H, d, *J* = 8.60), 3.42 (2 H, d, *J* = 8.60), 2.96 (2 H, t, *J* = 7.30), 2.41 (3 H, s), 1.97–1.86 (2 H, m), 1.82–1.74 (2 H, m), 1.58–1.47 (2 H, m)]¹² ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.61, 143.72, 134.47, 129.26, 128.13, 38.14, 33.67, 32.65, 27.89, 23.41, 21.62.

6-Bromo-1-(4-ethylphenyl)hexan-1-one (1c). Yield 75 %. ¹H-NMR (CDCl₃) 7.89 (2 H, d, *J* = 8.34), 7.29 (2 H, d, *J* = 8.49), 3.43 (2 H, t, *J* = 6.79), 2.99–2.96 (2 H, m), 2.74–2.68 (2 H, m), 1.95–1.88 (2 H, m), 1.81–1.73 (2 H, m), 1.57–1.50 (2 H, m), 1.26 (3 H, t, *J* = 7.60) [Lit. CDCl₃: 7.88 (1 H, d, *J* = 8.60), 7.28 (1 H, d, *J* = 8.60), 3.43 (2 H, t, *J* = 7.00), 2.97 (2 H, t, *J* = 7.30), 2.71 (2 H, q, *J* = 7.20), 2.04–1.48 (6 H, m), 1.26 (3 H, t, *J* = 7.60)]¹² ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.65, 148.91, 133.65, 127.22, 127.06, 37.16, 32.67, 31.64, 27.91, 26.89, 22.41, 14.22.

6-Bromo-1-(4-*n*-propylphenyl)hexan-1-one (1d). Yield 74 %. ¹H-NMR (CDCl₃) 7.84 (2 H, d, *J* = 8.32), 7.23 (2 H, d, *J* = 8.35), 3.40 (2 H, t, *J* = 6.78), 2.94 (2 H, t, *J* = 7.24), 2.63–2.60 (2 H, m), 1.92–1.86 (2 H, m), 1.77–1.71 (2 H, m), 1.67–1.60 (2 H, m), 1.53–1.47 (2 H, m), 0.92 (3 H, t, *J* = 7.34) ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.69, 148.45, 134.75, 128.71, 128.17, 38.20, 38.04, 33.69, 32.70, 27.95, 24.26, 23.46, 13.81.

6-Bromo-1-(4-*iso*-propylphenyl)hexan-1-one (1e). Yield 65 %. ¹H-NMR (CDCl₃) 7.89 (2 H, d, *J* = 8.40), 7.30 (2 H, d, *J* = 8.14), 3.42 (2 H, t, *J* = 6.79), 2.99–2.93 (3 H, m), 1.94–1.88 (2 H, m), 1.79–1.73 (2 H, m), 1.56–1.49 (2 H, m), 1.26 (6 H, d, *J* = 6.93) ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.66, 154.50, 134.88, 128.31, 126.70, 38.21, 34.27, 33.69, 32.70, 27.96, 23.72, 23.47.

6-Bromo-1-(4-*n*-butylphenyl)hexan-1-one (1f). Yield 44 %. ¹H-NMR (CDCl₃) 7.98 (2 H, d, *J* = 8.25), 7.37 (2 H, d, *J* = 8.03), 3.53 (2 H, t, *J* = 6.77), 3.09–3.06 (2 H, m), 2.79–2.76 (2 H, m), 2.05–2.00 (2 H, m), 1.91–1.85 (2 H, m), 1.76–1.70 (2 H, m), 1.67–1.61 (2 H, m), 1.51–1.43 (2 H, m), 1.04 (3 H, t, *J* = 7.32) ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.66, 148.69, 134.71, 128.66, 128.19, 38.20, 35.71, 33.68, 33.29, 32.70, 27.95, 23.46, 22.36, 13.95.

6-Bromo-1-(4-*iso*-butylphenyl)hexan-1-one (1g). Yield 68 %. ¹H-NMR (CDCl₃) 7.89 (2 H, d, *J* = 8.28), 7.23 (2 H, d, *J* = 8.28), 3.43 (2 H, t, *J* = 6.79), 2.97 (2 H, t, *J* = 7.35), 2.21 (2 H, d, *J* = 7.21). 1.95–1.88 (3 H, m), 1.81–1.75 (2 H, m), 1.57–1.51 (2 H, m), 0.92 (6 H, t, *J* = 6.62) ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.64, 147.44, 134.79, 129.31, 128.01, 45.38, 38.17, 33.61, 32.68, 30.11, 27.93, 23.43, 22.35.

6-Bromo-1-(4-*tert*-butylphenyl)hexan-1-one (1h). Yield 60 %. ¹H-NMR (CDCl₃) 7.89 (2 H, d, *J* = 8.50), 7.47 (2 H, d, *J* = 8.52), 3.41 (2 H, t, *J* = 6.79), 2.96 (2 H, t, *J* = 7.35), 1.94–1.88 (2 H, m), 1.79–1.73 (2 H, m), 1.56–1.50 (2 H, m), 1.34 (9 H, s) ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.60, 156.68, 134.44, 128.00, 125.53, 38.18, 35.10, 33.62, 32.68, 31.12, 27.94, 23.46.

5-Bromo-1-phenylpentan-1-one (1i). Yield 11 %. ¹H-NMR (CDCl₃) 7.96–7.94 (2 H, m), 7.58–7.54 (1 H, m), 7.48–7.45 (2 H, m), 3.38 (2 H, t, *J* = 6.62), 3.03–3.00 (2 H, m), 1.99–1.87 (4 H, m) [Lit. CDCl₃: 7.90–7.10 (5 H, m), 3.40 (2 H, t), 2.99 (2 H, t), 1.91 (4 H, m)] ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.53, 136.80, 133.05, 128.59, 127.97, 37.38, 33.29, 32.16, 22.72.

5-Bromo-1-(4-methylphenyl)pentan-1-one (1j). Yield 57 %. ¹H-NMR (CDCl₃) 7.83 (2 H, d, *J* = 8.20), 7.23 (2 H, d, *J* = 7.88), 3.43–3.41 (2 H, m), 2.97–2.94 (2 H, m), 2.38 (3 H, s), 1.94–1.84 (4 H, m) ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.16, 143.83, 134.38, 129.29, 128.13, 37.29, 33.41, 32.25, 22.86, 21.63.

5-Bromo-1-(4-ethylphenyl)pentan-1-one (1k). Yield 68 %. ¹H-NMR (CDCl₃) 7.78 (2 H, d, *J* = 8.03), 7.17 (2 H, d, *J* = 8.03), 3.34–3.31 (2 H, m), 2.88–2.85 (2 H, m), 2.62–2.57 (2 H, m), 1.84–1.76 (4 H, m), 1.15 (3 H, t, *J* = 7.53) ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.19, 150.02, 134.66, 128.29, 128.15, 37.35, 33.39, 32.32, 28.98, 22.93, 15.25.

5-Bromo-1-(4-*n*-propylphenyl)pentan-1-one (1l). Yield 55 %. ¹H-NMR (CDCl₃) 7.87 (2 H, d, *J* = 8.33), 7.26 (2 H, d, *J* = 8.45), 3.46–3.43 (2 H, m), 3.00–2.97 (2 H, m), 2.66–2.62 (2 H, m), 1.99–1.85 (4 H, m), 1.71–1.61 (2 H, m), 0.94 (3 H, t, *J* = 7.33) ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.26, 148.54, 134.63, 128.72, 128.15, 38.02, 37.32, 33.38, 32.27, 24.23, 22.88, 13.77.

5-Bromo-1-(4-*iso*-propylphenyl)pentan-1-one (1m). Yield 33 %. ¹H-NMR (CDCl₃) 7.88 (2 H, d, *J* = 8.20), 7.30 (2 H, d, *J* = 8.20), 3.45 (2 H, t, *J* = 6.62), 2.99–2.93 (3 H, m), 1.98–1.85 (4 H, m), 1.26 (6 H, d, *J* = 6.94) ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.21, 154.57, 134.74, 128.28, 126.70, 37.31, 34.23, 33.38, 32.25, 23.67, 22.87.

5-Bromo-1-(4-*n*-butylphenyl)pentan-1-one (1n). Yield 37 %. ¹H-NMR (CDCl₃) 7.78 (2 H, d, *J* = 8.33), 7.16 (2 H, d, *J* = 8.43), 3.36–3.33 (2 H, m), 2.90–2.87 (2 H, m), 2.59–2.55 (2 H, m), 1.89–1.75 (4 H, m), 1.56–1.48 (2 H, m), 1.31–1.22 (2 H, m), 0.84 (3 H, t, *J* = 7.37) ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.18, 148.77, 134.60, 128.67, 128.18, 37.31, 35.69, 33.38, 33.26, 32.29, 22.89, 22.35, 13.93.

5-Bromo-1-(4-*iso*-butylphenyl)pentan-1-one (1o). Yield 51 %. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 7.87 (2 H, d, $J = 8.21$), 7.23 (2 H, d, $J = 8.14$), 3.46–3.43 (2 H, m), 3.00–2.97 (2 H, m), 2.53 (2 H, d, $J = 7.22$), 1.97–1.86 (5 H, m), 0.90 (6 H, d, $J = 6.65$) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 199.29, 147.61, 134.66, 129.37, 128.03, 45.41, 37.34, 33.42, 32.30, 30.15, 22.89, 22.38.

5-Bromo-1-(4-*tert*-butylphenyl)pentan-1-one (1p). Yield 58 %. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 7.81 (2 H, d, $J = 8.66$), 7.39 (2 H, d, $J = 8.67$), 3.37–3.34 (2 H, m), 2.91–2.88 (2 H, m), 1.90–1.77 (4 H, m), 1.25 (9 H, s) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 199.22, 156.81, 134.31, 128.02, 125.58, 37.32, 35.12, 33.38, 32.27, 31.11, 22.89.

4-Bromo-1-phenylbutan-1-one (1q). Yield 38 %. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 7.85–7.83 (2 H, m), 7.45–7.41 (1 H, m), 7.34–7.31 (2 H, m), 3.41 (2 H, t, $J = 6.38$), 3.03 (2 H, t, $J = 6.93$), 2.19–2.14 (2 H, m) fena¹² $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 198.36, 136.43, 132.93, 128.37, 127.72, 36.30, 33.43, 26.64.

4-Bromo-1-(4-methylphenyl)butan-1-one (1r). Yield 52 %. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 7.85 (2 H, d, $J = 8.21$), 7.23 (2 H, d, $J = 7.92$), 3.51 (2 H, t, $J = 6.43$), 3.11 (2 H, t, $J = 6.98$), 2.38 (3 H, s), 2.29–2.24 (2 H, m) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 198.14, 143.80, 134.09, 129.13, 127.93, 36.23, 33.54, 26.82, 21.48.

4-Bromo-1-(4-ethylphenyl)butan-1-one (1s). Yield 56 %. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 7.90 (2 H, d, $J = 8.24$), 7.28 (2 H, d, $J = 8.21$), 3.54 (2 H, t, $J = 6.44$), 3.15 (2 H, t, $J = 6.98$), 2.73–2.68 (2 H, m), 2.32–2.27 (2 H, m), 1.26 (3 H, t, $J = 7.68$) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 198.32, 150.15, 134.51, 128.25, 128.14, 36.47, 33.74, 28.97, 27.04, 15.25.

4-Bromo-1-(4-*n*-propylphenyl)butan-1-one (1t). Yield 56 %. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 7.91 (2 H, d, $J = 8.26$), 7.28 (2 H, d, $J = 8.31$), 3.55 (2 H, t, $J = 6.39$), 3.16 (2 H, t, $J = 6.95$), 2.67–2.64 (2 H, m), 2.33–2.28 (2 H, m), 1.71–1.64 (2 H, m), 0.96 (3 H, t, $J = 7.40$) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 198.22, 148.50, 134.37, 128.58, 127.99, 37.87, 36.30, 33.57, 26.86, 24.08, 13.63.

4-Bromo-1-(4-*iso*-propylphenyl)butan-1-one (1u). Yield 70 %. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 7.93 (2 H, d, $J = 8.34$), 7.33 (2 H, d, $J = 8.26$), 3.55 (2 H, t, $J = 6.38$), 3.17 (2 H, t, $J = 6.93$), 3.01–2.95 (1 H, m), 2.34–2.29 (2 H, m), 1.28 (6 H, d, $J = 6.93$) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 198.39, 154.74, 134.68, 128.29, 126.73, 36.46, 34.27, 33.68, 27.03, 23.68.

4-Bromo-1-(4-*n*-butylphenyl)butan-1-one (1v). Yield 38 %. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 7.80 (2 H, d, $J = 8.30$), 7.17 (2 H, d, $J = 8.36$), 3.45 (2 H, t, $J = 6.40$), 3.05 (2 H, t, $J = 6.94$), 2.58–2.55 (2 H, m), 2.22–2.17 (2 H, m), 1.55–1.49 (2 H, m), 1.30–1.22 (2 H, m), 0.84 (3 H, t, $J = 7.38$) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 198.34, 148.90, 134.52, 128.68, 128.16, 36.46, 35.69, 33.67, 33.23, 27.04, 22.33, 13.92.

4-Bromo-1-(4-*iso*-butylphenyl)butan-1-one (1w). Yield 51 %. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 7.88 (2 H, d, $J = 8.25$), 7.22 (2 H, d, $J = 8.21$), 3.53 (2 H, t, $J = 6.39$), 3.14 (2 H, t, $J = 6.94$), 2.52 (2 H, d, $J = 7.20$), 2.31–2.26 (2 H, m), 1.93–1.85 (1 H, m), 0.90 (6 H, d, $J = 6.63$) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 198.32, 147.60, 134.45, 129.25, 127.90, 45.28, 36.35, 33.56, 29.99, 26.92, 22.23.

4-Bromo-1-(4-*tert*-butylphenyl)butan-1-one (1x). Yield 47 %. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 7.92 (2 H, d, $J = 8.66$), 7.49 (2 H, d, $J = 8.66$), 3.56–3.54 (2 H, m), 3.16 (2 H, t, $J = 6.93$), 2.34–2.28 (2 H, m), 1.35 (9 H, s) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 198.46, 156.98, 134.21, 127.99, 125.58, 36.44, 35.12, 33.66, 31.08, 27.00.

6-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-phenylhexan-1-one (2a). Yield 22 %. mp 130 °C IR 2942, 2363, 1680, 1596, 1448, 1318, 1180 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.45 (1 H, s), 7.96–7.94 (2 H, m), 7.59–7.45 (7 H, m), 7.31–7.27 (4 H, m), 7.20–7.17 (2 H, m), 3.46 (2 H, d, *J* = 10.83), 3.00–2.97 (2 H, m), 2.85–2.83 (2 H, m), 2.62–2.59 (3 H, m), 2.17–2.14 (2 H, m), 1.79–1.76 (4 H, m), 1.61 (2 H, d, *J* = 13.78), 1.44–1.41 (2 H, m) ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.92, 167.85, 145.55, 136.88, 133.09, 128.63, 128.32, 128.01, 126.69, 125.58, 78.85, 52.58, 42.61, 37.98, 26.57, 23.93, 23.43 LC/MS-MS 442.11 (M+H⁺).

6-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-methylphenyl)hexan-1-one (2b). Yield 26 %. mp 169 °C IR 2934, 2364, 1684, 1604, 1447, 1383, 1344, 1320, 1179 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.44 (1 H, s), 7.81 (2 H, d, *J* = 8.14), 7.47 (4 H, d, *J* = 7.70), 7.28–7.21 (6 H, m), 7.16–7.13 (2 H, m), 3.38 (2 H, d, *J* = 11.19), 2.92 (2 H, t, *J* = 7.09), 2.78–2.75 (2 H, m), 2.60–2.49 (3 H, m), 2.38 (3 H, s), 2.14–2.06 (2 H, m), 1.75–1.69 (4 H, m), 1.56 (2 H, d, *J* = 13.83), 1.41–1.34 (2 H, m) ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.64, 168.13, 145.62, 143.90, 134.42, 129.32, 128.32, 128.17, 126.69, 125.62, 78.90, 52.72, 42.70, 37.92, 26.68, 24.11, 23.60, 21.67 LC/MS-MS 456.13 (M+H⁺).

6-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-ethylphenyl)hexan-1-one (2c). Yield 36 %. mp 174 °C IR 2939, 1685, 1605, 1447, 1383, 1345, 1320, 1286, 1148 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.48 (1 H, s), 7.86 (2 H, d, *J* = 8.33), 7.51–7.49 (4 H, m), 7.30–7.26 (6 H, m), 7.19–7.16 (2 H, m), 3.38 (2 H, d, *J* = 11.17), 2.94 (2 H, t, *J* = 7.10), 2.77–2.68 (4 H, m), 2.63–2.45 (3 H, m), 2.15–2.05 (2 H, m), 1.78–1.69 (4 H, m), 1.58 (2 H, d, *J* = 13.44), 1.43–1.36 (2 H, m), 1.25 (3 H, t, *J* = 7.60) ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.65, 150.05, 145.62, 134.62, 128.31, 128.26, 128.12, 126.67, 125.59, 78.92, 42.73, 37.94, 28.95, 26.72, 24.23, 23.62, 15.23 LC/MS-MS 470.18 (M+H⁺).

6-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-*n*-propylphenyl)hexan-1-one (2d). Yield 43 %. mp 172 °C IR 2940, 2395, 1686, 1605, 1447, 1384, 1345, 1318, 1286, 1177 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.27 (1 H, s), 7.64 (2 H, d, *J* = 8.33), 7.30–7.28 (4 H, m), 7.09–7.03 (6 H, m), 6.96 (2 H, t, *J* = 7.34), 3.17 (2 H, d, *J* = 11.10), 2.73 (2 H, t, *J* = 7.11), 2.56–2.53 (2 H, m), 2.44–2.23 (5 H, m), 1.95–1.85 (2 H, m), 1.57–1.35 (8 H, m), 1.22–1.16 (2 H, m), 0.73 (3 H, t, *J* = 7.37) ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.64, 167.99, 148.52, 145.58, 128.69, 128.28, 128.12, 126.65, 125.55, 119.97, 52.75, 43.18, 42.71, 38.00, 37.91, 26.70, 24.21, 23.58, 13.75 LC/MS-MS 484.24 (M+H⁺).

6-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-*iso*-propylphenyl)hexan-1-one (2e). Yield 43 %. mp 154 °C IR 2936, 2360, 1686, 1606, 1446, 1382, 1345, 1317, 1286, 1181 ¹H-NMR (d₄-MeOH) 8.53 (1 H, s), 7.91 (2 H, d, *J* = 8.35), 7.53–7.51 (4 H, m), 7.36 (2 H, d, *J* = 8.25), 7.31–7.28 (4 H, m), 7.19–7.16 (2 H, m), 3.51 (2 H, d, *J* = 12.19), 3.05–2.92 (7 H, m), 2.86–2.80 (1 H, m), 1.83–1.69 (8 H, m), 1.46–1.40 (2 H, m), 1.26 (6 H, d, *J* = 6.93) ¹³C-NMR (d₄-MeOH) 202.03, 156.18, 147.20, 136.14, 129.54, 129.47, 129.25, 129.19, 127.87, 127.80, 127.67, 127.13, 79.87, 53.91, 42.96, 38.90, 35.51, 27.33, 25.50, 25.16, 24.80, 24.09 LC/MS-MS 484.24 (M+H⁺).

6-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-*n*-butylphenyl)hexan-1-one (2f). Yield 41 %. mp 142 °C IR 2947, 2337, 1684, 1606, 1446, 1383, 1345, 1316, 1285, 1177 ¹H-NMR (d₄-MeOH) 8.53 (1 H, s), 7.90 (2 H, d, *J* = 8.27), 7.53–7.51 (4 H, m), 7.32–7.28 (6 H, m), 7.18 (2 H, t, *J* = 7.32), 3.52 (2 H, d, *J* = 12.35), 3.05–2.93 (6 H, m), 2.85–2.81 (1 H, m), 2.69–2.66 (2 H, m), 1.84–1.70 (8 H, m), 1.65–1.59 (2 H, m), 1.46–1.33 (4 H, m), 0.94 (3 H, t, *J* = 7.34) ¹³C-NMR (d₄-MeOH) 204.60, 152.84, 149.71, 138.49, 132.38, 132.32, 131.92, 131.87, 131.70, 130.18, 129.63, 82.37, 56.42, 45.46, 39.13, 37.09, 29.81, 28.02, 27.66, 27.28, 25.88, 16.78 LC/MS-MS 498.24 (M+H⁺).

6-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-*iso*-butylphenyl)hexan-1-one (2g). Yield 43 %. mp 201 °C IR 2940, 2357, 1684, 1605, 1446, 1385, 1345, 1286, 1177 ¹H-NMR (d₄-MeOH) 8.54 (1 H, s), 7.91 (2 H, d, *J* = 8.29), 7.54–7.52 (4 H, m), 7.32–7.29 (6 H, m), 7.20–7.17 (2 H, m), 3.52 (2 H, d, *J* = 12.22), 3.06–2.94 (6 H, m), 2.86–2.81 (1 H, m), 2.56 (2 H, d, *J* = 7.22), 1.96–1.72 (10 H, m), 1.48–1.42 (2 H, m), 0.92 (6 H, d, *J* = 6.63) ¹³C-NMR (d₄-MeOH) 200.20, 149.13, 147.16, 136.06, 130.54, 129.18, 127.68, 127.12, 79.88, 53.96, 46.29, 42.97, 31.35, 27.27, 25.55, 25.52, 25.18, 24.71, 22.67 LC/MS-MS 498.23 (M+H⁺).

6-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-*tert*-butylphenyl)hexan-1-one (2h). Yield 56 %. mp 67 °C IR 2962, 2359, 1677, 1603, 1447, 1271, 1191 ¹H-NMR (d₄-MeOH) 8.48 (1 H, s), 7.92 (2 H, d, *J* = 8.49), 7.54–7.51 (6 H, m), 7.31–7.28 (4 H, m), 7.18 (2 H, t, *J* = 7.30), 3.53 (2 H, d, *J* = 12.10), 3.07–2.96 (6 H, m), 2.86–2.81 (1 H, m), 1.84–1.74 (8 H, m), 1.47–1.41 (2 H, m), 1.34 (9 H, s) ¹³C-NMR (d₄-MeOH) 202.08, 158.30, 147.16, 135.67, 129.19, 127.65, 127.11, 126.73, 112.07, 79.86, 53.87, 42.89, 38.89, 36.00, 31.49, 27.26, 25.07, 24.80, 24.77 LC/MS-MS 498.23 (M+H⁺).

5-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-phenylpentan-1-one (2i). Yield 25 %. mp 143 °C IR 3059, 2954, 2361, 1682, 1595, 1446, 1388, 1341, 1206 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.31 (1 H, s), 7.81–7.79 (2 H, m), 7.45–7.42 (1 H, m), 7.38–7.37 (4 H, m), 7.35–7.32 (2 H, m), 7.17–7.14 (4 H, m), 7.06–7.03 (2 H, m), 3.33 (2 H, d, *J* = 11.67), 2.92–2.90 (2 H, m), 2.76–2.73 (2 H, m), 2.51–2.43 (3 H, m), 2.05–1.96 (2 H, m), 1.70–1.61 (4 H, m), 1.47 (2 H, d, *J* = 14.19) ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.46, 145.57, 136.68, 133.22, 128.66, 128.30, 127.98, 126.67, 125.58, 78.84, 52.64, 42.63, 37.60, 23.76, 21.24 LC/MS-MS 428.10 (M+H⁺).

5-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-methylphenyl)pentan-1-one (2j). Yield 40 %. mp 165 °C IR 2953, 2358, 1679, 1592, 1445, 1387, 1343, 1318, 1180 ¹H-NMR (CDCl₃ + d₄-MeOH) 8.44 (1 H, s), 7.76 (2 H, d, *J* = 8.28), 7.43 (4 H, d, *J* = 7.28), 7.23–7.17 (6 H, m), 7.11–7.07 (2 H, m), 3.42 (2 H, d, *J* = 12.05), 2.97–2.85 (4 H, m), 2.58–2.52 (3 H, m), 2.33 (3 H, s), 2.03–1.90 (2 H, m), 1.72–1.67 (4 H, m), 1.52 (2 H, d, *J* = 14.56) ¹³C-NMR (CDCl₃ + d₄-MeOH) 199.21, 168.45, 145.32, 143.90, 133.78, 129.02, 127.93, 127.79, 126.25, 125.16, 78.01, 52.32, 42.18, 37.02, 23.13, 23.11, 23.06, 21.26, 20.79, 20.74 LC/MS-MS 442.20 (M+H⁺).

5-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-ethylphenyl)pentan-1-one (2k). Yield 30 %. mp 167 °C IR 2953, 2362, 1678, 1605, 1446, 1388, 1342, 1318, 1178 ¹H-NMR (CDCl₃ + d₄-MeOH) 8.38 (1 H, s), 7.78 (2 H, d, *J* = 8.34), 7.42 (4 H, d, *J* = 9.52), 7.23–7.19 (6 H, m), 7.11–7.08 (2 H, m), 3.36 (2 H, d, *J* = 11.60), 2.94–2.91 (2 H, m), 2.79–2.75 (2 H, m), 2.63 (2 H, q, *J* = 7.60), 2.56–2.40 (3 H, m), 2.03 (2 H, d, *J* = 12.51), 1.72–1.69 (4 H, m), 1.52 (2 H, d, *J* = 13.92), 1.18 (3 H, t, *J* = 7.62) ¹³C-NMR (CDCl₃ + d₄-MeOH) 199.16, 168.05, 150.19, 145.59, 134.44, 128.29, 128.21, 128.14, 126.65, 125.58, 78.86, 52.66, 42.67, 37.52, 30.92, 28.92, 23.87, 23.53, 21.38, 15.17 LC/MS-MS 465.20 (M+H⁺).

5-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-*n*-propylphenyl)pentan-1-one (2l). Yield 37 %. mp 166 °C IR 3059, 2954, 2357, 1679, 1605, 1446, 1384, 1341, 1315, 1179 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.37 (1 H, s), 7.77 (2 H, d, *J* = 8.24), 7.42 (4 H, d, *J* = 7.91), 7.22–7.16 (6 H, m), 7.10–7.07 (2 H, m), 3.34 (2 H, d, *J* = 11.46), 2.93–2.90 (2 H, m), 2.75–2.73 (2 H, m), 2.57–2.42 (5 H, m), 2.06–1.97 (2 H, m), 1.68–1.48 (8 H, m), 0.86 (3 H, t, *J* = 7.31) ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.19, 168.15, 148.67, 145.67, 134.46, 128.74, 128.26, 128.12, 126.62, 125.61, 78.84, 52.62, 42.70, 38.00, 37.54, 24.19, 23.89, 23.57, 21.40, 13.75 LC/MS-MS 470.22 (M+H⁺).

5-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-*iso*-propylphenyl)pentan-1-one (2m). Yield 33 %. mp 166 °C IR 2963, 2360, 1679, 1596, 1447, 1389, 1342, 1317, 1188 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.37 (1 H, s), 7.80 (2 H, d, *J* = 8.20), 7.42 (4 H, d, *J* = 8.20), 7.23–7.19 (6 H, m), 7.11–7.08 (2 H, m), 3.34 (2 H, d, *J* = 11.98), 2.93–2.85 (3 H, m), 2.78–2.75 (2 H, m), 2.54–2.44 (3 H, m), 2.06–1.99 (2 H, m), 1.69–1.68 (4 H, m), 1.51 (2 H, d, *J* = 13.87), 1.18 (6 H, d, *J* = 6.94) ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.17, 168.13, 154.75, 145.63, 134.58, 128.29, 128.26, 126.73, 125.59, 126.64, 78.85, 42.68, 37.53, 34.24, 23.86, 23.65, 21.38 LC/MS-MS 470.30 (M+H⁺).

5-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)-piperidin-1-yl)-1-(4-*n*-butylphenyl)pentan-1-one (2n). Yield 28 %. mp 157 °C IR 2955, 2365, 1679, 1604, 1447, 1387, 1341, 1314, 1248, 1183 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.37 (1 H, s), 7.77 (2 H, d, *J* = 8.24), 7.42 (4 H, d, *J* = 7.41), 7.22–7.17 (6 H, m), 7.11–7.07 (2 H, m), 3.37 (2 H, d, *J* = 11.56), 2.94–2.91 (2 H, m), 2.79–2.76 (2 H, m), 2.60–2.45 (5 H, m), 2.09–2.00 (2 H, m), 1.71–1.65 (4 H, m), 1.57–1.49 (4 H, m), 1.32–1.24 (2 H, m), 0.85 (3 H, t, *J* = 7.29) ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.17, 168.09, 148.96, 145.62, 134.41, 128.70, 128.30, 128.14, 126.65, 125.59, 78.85, 52.64, 42.66, 37.52, 35.69, 33.23, 23.84, 23.51, 22.32, 21.37, 13.91 LC/MS-MS 484.34 (M+H⁺).

5-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)-piperidin-1-yl)-1-(4-*iso*-butylphenyl)pentan-1-one (2o). Yield 29 %. mp 173 °C IR 2953, 2365, 1679, 1605, 1447, 1387, 1341, 1318, 1234, 1187 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.47 (1 H, s), 7.87–7.85 (2 H, m), 7.52–7.50 (4 H, m), 7.30–7.19 (8 H, m), 3.45–3.43 (2 H, m), 3.03–3.01 (2 H, m), 2.85–2.84 (2 H, m), 2.64–2.53 (5 H, m), 2.16–2.11 (2 H, m), 1.94–1.89 (1 H, m), 1.78 (4 H, m), 1.60 (2 H, d, *J* = 13.64), 0.93–0.91 (6 H, m) ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.19, 167.96, 147.75, 145.56, 134.51, 129.38, 128.32, 127.99, 126.69, 125.58, 78.90, 52.69, 45.39, 42.71, 37.53, 30.10, 23.91, 23.57, 22.34, 21.41 LC/MS-MS 484.34 (M+H⁺).

5-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)-piperidin-1-yl)-1-(4-*tert*-butylphenyl)pentan-1-one (2p). Yield 26 %. mp 171 °C IR 2964, 2365, 1684, 1588, 1446, 1380, 1342, 1322, 1230, 1188 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.38 (1 H, s), 7.81–7.79 (2 H, m), 7.43–7.39 (6 H, m), 7.23–7.20 (4 H, m), 7.12–7.09 (2 H, m), 3.37–3.35 (2 H, d, *J* = 10.49), 2.94–2.92 (2 H, m), 2.77–2.76 (2 H, m), 2.55–2.45 (3 H, m), 2.08–2.01 (1 H, m), 1.70 (4 H, m), 1.52 (2 H, d, *J* = 14.12), 1.26 (9 H, s) ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.16, 167.91, 156.99, 145.55, 134.16, 128.32, 127.97, 126.70, 125.60, 125.58, 78.90, 52.73, 52.69, 42.70, 37.54, 35.13, 31.09, 23.89, 23.58, 23.55, 21.42 LC/MS-MS 484.31 (M+H⁺).

4-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-phenylbutan-1-one (2q). Yield 18 %. mp 175 °C IR 2358, 1681, 1596, 1489, 1447, 1365, 1345, 1065 ¹H-NMR (d₄-MeOH) 8.53 (1 H, s), 8.00–7.99 (2 H, m), 7.61 (1 H, t, *J* = 7.41), 7.54–7.49 (6 H, m), 7.32–7.28 (4 H, m), 7.18 (2 H, t, *J* = 7.36), 3.57 (2 H, d, *J* = 12.26), 3.20–3.17 (2 H, m), 3.12–3.09 (2 H, m), 3.01–2.96 (2 H, m), 2.88–2.82 (1 H, m), 2.13–2.07 (2 H, m), 1.86–1.72 (4 H, m) [Lit. 200 MHz, CDCl₃: 7.90–7.05 (15 H, m), 2.89 (4 H, m), 2.31 (3 H, m), 1.98–1.77 (4 H, m), 1.52–1.20 (4 H, m)]¹⁴ ¹³C-NMR (d₄-MeOH) 198.98, 145.82, 136.52, 133.16, 128.42, 127.79, 127.71, 126.26, 125.71, 78.49, 55.98, 52.63, 47.64, 41.59, 34.77, 24.17, 18.35 LC/MS-MS 414.18 (M+H⁺).

4-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-methylphenyl)butan-1-one (2r). Yield 13 %. mp 191 °C IR 2358, 1681, 1596, 1489, 1447, 1365, 1345, 1065 ¹H-NMR (d₄-MeOH) 8.53 (1 H, s), 7.89 (2 H, d, *J* = 8.24), 7.54–7.52 (4 H, m), 7.32–7.28 (6 H, m), 7.18 (2 H, t, *J* = 7.35), 3.56 (2 H, d, *J* = 12.32), 3.16–3.08 (4 H, m), 3.00–2.95 (2 H, m), 2.88–2.82 (1 H, m), 2.40 (3 H, s), 2.10–2.06 (2 H, m), 1.86–1.71 (4 H, m) ¹³C-NMR (d₄-

MeOH) 200.22, 147.24, 145.74, 133.45, 130.44, 129.30, 129.21, 127.67, 127.12, 79.90, 54.03, 43.00, 25.57, 21.66, 19.76, 19.70 LC/MS-MS 428.32 (M+H⁺) [Lit. 428 (M+H⁺)]¹⁵.

4-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-ethylphenyl)butan-1-one (2s). Yield 20 %. mp 204 °C IR 2968, 2358, 1687, 1606, 1446, 1388, 1346, 1183 ¹H-NMR (d₄-MeOH) 8.52 (1 H, s), 7.92 (2 H, d, *J* = 8.33), 7.54–7.52 (4 H, m), 7.35–7.28 (6 H, m), 7.19–7.16 (2 H, m), 3.56 (2 H, d, *J* = 12.34), 3.17–3.08 (4 H, m), 3.01–2.95 (2 H, m), 2.87–2.81 (1 H, m), 2.74–2.69 (2 H, m), 2.12–2.06 (2 H, m), 1.85–1.72 (4 H, m), 1.25 (3 H, t, *J* = 7.62) ¹³C-NMR (d₄-MeOH) 200.19, 151.95, 147.19, 135.67, 129.40, 129.28, 129.18, 127.67, 127.12, 79.91, 54.09, 43.02, 36.08, 29.89, 25.62, 19.87, 15.70 LC/MS-MS 442.32 (M+H⁺) [Lit. 442 (M+H⁺)]¹⁵.

4-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-*n*-propylphenyl)butan-1-one (2t). Yield 10 %. mp 182 °C IR 3182, 2359, 1684, 1602, 1446, 1388, 1347 ¹H-NMR (d₄-MeOH) 8.54 (1 H, s), 7.92 (2 H, d, *J* = 8.31), 7.55–7.53 (4 H, m), 7.34–7.29 (6 H, m), 7.20–7.17 (2 H, t, *J* = 7.35), 3.56 (2 H, d, *J* = 12.20), 3.18–3.08 (4 H, m), 3.00–2.95 (2 H, m), 2.87–2.82 (1 H, m), 2.69–2.66 (2 H, m), 2.11–2.07 (2 H, m), 1.83–1.64 (6 H, m), 0.95 (3 H, t, *J* = 7.38) ¹³C-NMR (d₄-MeOH) 200.21, 150.33, 147.21, 135.71, 129.91, 129.31, 129.18, 127.66, 127.12, 79.91, 57.50, 54.08, 43.04, 38.96, 36.10, 25.62, 25.37, 19.89, 19.83, 14.02 LC/MS-MS 456.24 (M+H⁺) [Lit. 456 (M+H⁺)]¹⁵.

4-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-*iso*-propylphenyl)butan-1-one (2u). Yield 32 %. mp 189 °C IR 2960, 2366, 1691, 1596, 1446, 1345, 1189, 1062 ¹H-NMR (d₄-MeOH) 8.52 (1 H, s), 7.92 (2 H, d, *J* = 8.38), 7.54–7.52 (4 H, m), 7.37 (2 H, d, *J* = 8.26), 7.30 (4 H, t, *J* = 7.76), 7.19–7.16 (2 H, m), 3.56 (2 H, d, *J* = 12.30), 3.17–3.08 (4 H, m), 3.00–2.95 (3 H, m), 2.87–2.81 (1 H, m), 2.11–2.06 (2 H, m), 1.85–1.72 (4 H, m), 1.27 (6 H, t, *J* = 6.92) ¹³C-NMR (d₄-MeOH) 200.24, 156.44, 147.21, 135.82, 129.45, 129.19, 127.86, 127.67, 127.12, 79.90, 57.43, 54.06, 43.02, 36.10, 35.53, 25.59, 24.04, 19.80 LC/MS-MS 456.38 (M+H⁺).

4-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-*n*-butylphenyl)butan-1-one (2v). Yield 6 %. mp 161 °C IR 2963, 1687, 1607, 1448, 1362, 1182, 1139 ¹H-NMR (d₄-MeOH) 8.54 (1 H, s), 7.91 (2 H, d, *J* = 8.30), 7.54–7.52 (4 H, m), 7.33–7.28 (6 H, m), 7.18 (2 H, t, *J* = 7.33), 7.19–7.16 (2 H, m), 3.55 (2 H, d, *J* = 12.29), 3.16–3.06 (4 H, m), 2.98–2.93 (2 H, m), 2.87–2.81 (1 H, m), 2.70–2.67 (2 H, m), 2.12–2.06 (2 H, m), 1.85–1.71 (4 H, m), 1.65–1.59 (2 H, m), 1.40–1.32 (2 H, m), 0.94 (3 H, t, *J* = 7.40) ¹³C-NMR (d₄-MeOH) 200.23, 150.56, 147.23, 135.67, 129.85, 129.32, 129.18, 127.65, 127.12, 79.92, 57.50, 54.08, 43.07, 36.61, 36.11, 34.52, 25.62, 23.33, 19.91, 14.22 LC/MS-MS 470.17 (M+H⁺).

4-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-*iso*-butylphenyl)butan-1-one (2w). Yield 20 %. mp 155 °C IR 2956, 1689, 1605, 1448, 1385, 1316, 1193 ¹H-NMR (d₄-MeOH) 8.55 (1 H, s), 7.93 (2 H, d, *J* = 8.28), 7.55–7.53 (4 H, m), 7.33–7.29 (6 H, m), 7.19 (2 H, t, *J* = 7.33), 3.56 (2 H, d, *J* = 12.35), 3.18–3.08 (4 H, m), 3.00–2.95 (2 H, m), 2.88–2.83 (1 H, m), 2.56 (2 H, d, *J* = 7.23), 2.13–2.07 (2 H, m), 1.96–1.73 (5 H, m), 0.92 (6 H, d, *J* = 6.63) ¹³C-NMR (d₄-MeOH) 195.87, 149.37, 147.20, 135.75, 130.54, 129.18, 127.66, 127.12, 79.92, 54.11, 46.30, 43.05, 36.10, 31.35, 25.66, 22.66, 19.90, 19.85 LC/MS-MS 470.17 (M+H⁺).

4-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-*tert*-butylphenyl)butan-1-one (2x). Yield 27 %. mp 175 °C IR 2961, 2330, 1691, 1590, 1447, 1383, 1346, 1192 ¹H-NMR (d₄-MeOH) 8.39 (1 H, s), 7.93 (2 H, d, *J* =

8.58), 7.55–7.53 (6 H, m), 7.31–7.28 (4 H, m), 7.19–7.16 (2 H, m), 3.59 (2 H, d, $J = 12.22$), 3.18–3.12 (4 H, m), 3.04–3.00 (2 H, m), 2.89–2.84 (1 H, m), 2.13–2.07 (2 H, m), 1.89–1.80 (2 H, m), 1.74–1.71 (2 H, m), 1.34 (9 H, s) $^{13}\text{C-NMR}$ (d_4 -MeOH) 200.12, 168.28, 158.52, 147.21, 135.34, 129.21, 127.67, 127.10, 126.75, 79.87, 53.88, 42.88, 36.08, 36.02, 31.49, 25.40, 19.66 LC/MS-MS 470.03 ($\text{M}+\text{H}^+$) [Lit. 470 ($\text{M}+\text{H}^+$)]¹⁵.

6-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-phenylhexan-1-ol (3a). Yield 83 %. mp 80 °C IR 2941, 2503, 1492, 1448, 1345, 1066 $^1\text{H-NMR}$ (d_4 -MeOH) 7.52 (4 H, d, $J = 7.80$), 7.32–7.28 (8 H, m), 7.24–7.21 (1 H, m), 7.19–7.16 (2 H, m), 4.61–4.59 (1 H, m), 3.52 (2 H, d, $J = 12.23$), 3.03–2.96 (4 H, m), 2.88–2.82 (1 H, m), 1.82–1.66 (8 H, m), 1.49–1.29 (4 H, m) $^{13}\text{C-NMR}$ (d_4 -MeOH) 146.97, 146.31, 129.16, 129.05, 128.12, 127.53, 126.95, 126.91, 79.65, 74.79, 58.06, 53.90, 42.67, 39.71, 27.44, 26.21, 25.61, 24.93 LC/MS-MS 444.21 ($\text{M}+\text{H}^+$).

6-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-methylphenyl)hexan-1-ol (3b). Yield 62 %. mp 71 °C IR 2941, 2361, 1593, 1491, 1447, 1335, 1066 $^1\text{H-NMR}$ (d_4 -MeOH) 8.53 (1 H, s), 7.51 (4 H, d, $J = 7.39$), 7.31–7.28 (4 H, m), 7.21–7.16 (4 H, m), 7.12 (2 H, d, $J = 7.92$), 4.55 (1 H, t, $J = 6.62$), 3.48 (2 H, d, $J = 12.38$), 2.98–2.89 (4 H, m), 2.84–2.78 (1 H, m), 2.30 (3 H, s), 1.81–1.63 (8 H, m), 1.47–1.27 (4 H, m) $^{13}\text{C-NMR}$ (d_4 -MeOH) 170.17, 147.20, 143.39, 137.98, 129.91, 129.20, 127.68, 127.12, 127.07, 79.88, 74.85, 53.92, 42.99, 39.82, 27.68, 26.42, 25.56, 25.53, 25.24, 21.17 LC/MS-MS 458.21 ($\text{M}+\text{H}^+$).

6-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-ethylphenyl)hexan-1-ol (3c). Yield 82 %. mp 75 °C IR 2936, 2364, 1595, 1447, 1359, 1066 $^1\text{H-NMR}$ (d_4 -MeOH) 8.53 (1 H, s), 7.53–7.51 (4 H, m), 7.31–7.27 (4 H, m), 7.22 (2 H, d, $J = 8.04$), 7.19–7.14 (4 H, m), 4.56 (1 H, t, $J = 6.62$), 3.48 (2 H, d, $J = 12.67$), 2.99–2.90 (4 H, m), 2.85–2.79 (1 H, m), 2.63–2.59 (2 H, q, $J = 7.61$), 1.83–1.63 (8 H, m), 1.47–1.27 (4 H, m), 1.21 (3 H, t, $J = 7.59$) $^{13}\text{C-NMR}$ (d_4 -MeOH) 147.21, 144.55, 143.66, 129.20, 128.76, 127.67, 127.15, 127.11, 79.87, 74.87, 53.87, 42.95, 39.82, 29.57, 27.67, 26.43, 25.50, 25.18, 16.32 LC/MS-MS 472.21 ($\text{M}+\text{H}^+$).

6-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-*n*-propylphenyl)hexan-1-ol (3d). Yield 71 %. mp 73 °C IR 2933, 2364, 1596, 1448, 1334, 1179, 1064 $^1\text{H-NMR}$ (d_4 -MeOH) 8.54 (1 H, s), 7.52–7.51 (4 H, m), 7.31–7.27 (4 H, m), 7.22 (2 H, d, $J = 8.05$), 7.19–7.12 (4 H, m), 4.56 (1 H, t, $J = 6.55$), 3.45 (2 H, d, $J = 12.32$), 2.95–2.78 (5 H, m), 2.57–2.54 (2 H, m), 1.80–1.58 (10 H, m), 1.46–1.28 (4 H, m), 0.92 (3 H, t, $J = 7.38$) $^{13}\text{C-NMR}$ (d_4 -MeOH) 145.80, 142.28, 141.43, 127.98, 127.76, 126.23, 125.69, 125.63, 120.00, 79.47, 73.45, 56.54, 52.53, 41.65, 38.39, 37.32, 26.28, 25.03, 24.41, 24.17, 23.88, 12.68 LC/MS-MS 486.27 ($\text{M}+\text{H}^+$).

6-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-*iso*-propylphenyl)hexan-1-ol (3e). Yield 75 %. mp 62 °C IR 2961, 2364, 1597, 1448, 1333, 1180, 1064 $^1\text{H-NMR}$ (d_4 -MeOH) 8.53 (1 H, s), 7.51 (4 H, d, $J = 8.15$), 7.31–7.28 (4 H, m), 7.23 (2 H, d, $J = 8.12$), 7.19–7.16 (4 H, m), 4.58–4.55 (1 H, m), 3.47 (2 H, d, $J = 11.87$), 2.98–2.79 (6 H, m), 1.80–1.63 (7 H, m), 1.47–1.24 (4 H, m), 1.23 (6 H, d, $J = 6.93$) $^{13}\text{C-NMR}$ (d_4 -MeOH) 149.17, 147.19, 143.81, 129.20, 127.68, 127.29, 127.12, 79.88, 74.86, 53.91, 42.98, 39.81, 35.14, 27.68, 26.45, 25.54, 25.23, 24.54 LC/MS-MS 486.34 ($\text{M}+\text{H}^+$).

6-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-*n*-butylphenyl)hexan-1-ol (3f). Yield 55 %. mp 64 °C IR 2930, 2356, 1595, 1448, 1341, 1068 $^1\text{H-NMR}$ (d_4 -MeOH) 8.54 (1 H, s), 7.51 (4 H, d, $J = 7.37$), 7.31–7.27 (4 H, m), 7.22 (2 H, d, $J = 8.04$), 7.19–7.12 (4 H, m), 4.56 (1 H, m), 3.44 (2 H, d, $J = 12.00$), 2.93–2.76 (5 H, m), 2.58

(2 H, t, $J = 7.72$), 1.79–1.54 (10 H, m), 1.46–1.29 (6 H, m), 0.93 (3 H, t, $J = 7.40$) ^{13}C -NMR (d_4 -MeOH) 147.24, 143.66, 143.08, 129.35, 129.19, 127.67, 127.14, 79.91, 74.90, 54.01, 43.14, 39.81, 36.33, 35.07, 27.74, 26.47, 25.67, 25.38, 23.36, 14.32 LC/MS-MS 500.45 ($\text{M}+\text{H}^+$).

6-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-*iso*-butylphenyl)hexan-1-ol (3g). Yield 76 %. mp 70 °C IR 2953, 1596, 1447, 1339, 1168, 1065 ^1H -NMR (d_4 -MeOH) 8.55 (1 H, s), 7.53–7.52 (4 H, m), 7.32–7.29 (4 H, m), 7.25–7.17 (4 H, m), 7.11 (2 H, d, $J = 8.05$), 4.59–4.57 (1 H, m), 3.48 (2 H, d, $J = 12.41$), 2.98–2.79 (5 H, m), 2.47–2.45 (2 H, d, $J = 7.18$), 1.87–1.64 (9 H, m), 1.49–1.29 (4 H, m), 0.90 (6 H, d, $J = 6.62$) ^{13}C -NMR (d_4 -MeOH) 147.17, 143.76, 141.87, 130.05, 129.18, 127.67, 127.11, 126.93, 79.89, 74.88, 53.94, 46.13, 43.01, 39.76, 31.50, 27.66, 26.43, 25.25, 22.71, 19.23 LC/MS-MS 500.19 ($\text{M}+\text{H}^+$).

6-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-*tert*-butylphenyl)hexan-1-ol (3h). Yield 69 %. 73 °C IR 2957, 2365, 1597, 1447, 1341, 1171, 1066 ^1H -NMR (d_4 -MeOH) 8.52 (1 H, s), 7.53–7.52 (4 H, m), 7.37 (2 H, d, $J = 8.41$), 7.32–7.25 (6 H, m), 7.20–7.17 (2 H, m), 4.59–4.57 (1 H, m), 3.50 (2 H, d, $J = 12.34$), 3.02–2.94 (4 H, m), 2.86–2.80 (1 H, m), 1.83–1.65 (8 H, m), 1.49–1.32 (4 H, m), 1.31 (9 H, s) ^{13}C -NMR (d_4 -MeOH) 169.85, 151.33, 147.13, 143.35, 129.20, 127.69, 127.10, 126.84, 126.16, 79.88, 74.76, 53.87, 49.04, 42.90, 39.74, 35.32, 31.85, 27.63, 26.41, 25.14 LC/MS-MS 500.33 ($\text{M}+\text{H}^+$).

5-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-phenylpentan-1-ol (3i). Yield 75 %. mp 182 °C IR 2778, 2361, 1629, 1448, 1356, 1064 ^1H -NMR (d_4 -MeOH) 8.55 (2 H, s), 7.52–7.50 (4 H, m), 7.34–7.27 (8 H, m), 7.24–7.20 (1 H, m), 7.18–7.15 (2 H, m), 4.61 (1 H, t, $J = 5.78$), 3.45 (2 H, d, $J = 12.37$), 2.95–2.76 (5 H, m), 1.84–1.65 (8 H, m), 1.51–1.29 (3 H, m) ^{13}C -NMR (d_4 -MeOH) 147.20, 146.29, 129.34, 129.15, 128.32, 127.63, 127.11, 127.02, 79.89, 74.71, 53.93, 43.11, 39.53, 25.56, 25.28, 24.13 LC/MS-MS 430.14 ($\text{M}+\text{H}^+$).

5-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-methylphenyl)pentan-1-ol (3j). Yield 71 %. mp 84 °C IR 3340, 2951, 2361, 1595, 1491, 1447, 1330, 1173 ^1H -NMR (CDCl_3) 8.41 (1 H, s), 7.49 (4 H, d, $J = 7.53$), 7.29–7.25 (4 H, m), 7.20–7.09 (6 H, m), 4.61–4.60 (1 H, m), 3.41–3.38 (2 H, m), 2.82–2.80 (2 H, m), 2.58–2.55 (3 H, m), 2.31 (3 H, s), 2.15–2.08 (2 H, m), 1.82–1.67 (4 H, m), 1.54 (2 H, d, $J = 13.11$), 1.44–1.35 (2 H, m) ^{13}C -NMR (CDCl_3) 168.26, 145.65, 141.87, 136.90, 129.04, 128.29, 126.62, 125.78, 125.59, 78.74, 73.28, 52.47, 42.43, 38.27, 23.64, 23.05, 21.12 LC/MS-MS 444.38 ($\text{M}+\text{H}^+$).

5-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-ethylphenyl)pentan-1-ol (3k). Yield 80 %. mp 70 °C IR 2933, 1595, 1447, 1341, 1065 ^1H -NMR (d_4 -MeOH) 8.46 (1 H, s), 7.49 (4 H, d, $J = 8.27$), 7.28–7.25 (4 H, m), 7.21 (2 H, d, $J = 8.01$), 7.16–7.12 (4 H, m), 4.56 (1 H, t, $J = 6.90$), 3.46 (2 H, d, $J = 12.17$), 2.99–2.90 (4 H, m), 2.82–2.78 (1 H, m), 2.58 (1 H, q, $J = 7.58$), 1.79–1.65 (8 H, m), 1.45–1.27 (2 H, m), 1.17 (3 H, t, $J = 7.59$) ^{13}C -NMR (d_4 -MeOH) 145.74, 143.24, 142.06, 127.79, 127.40, 126.28, 125.69, 120.02, 78.43, 73.19, 52.47, 41.45, 37.99, 36.34, 28.15, 23.67, 22.65, 14.91 LC/MS-MS 458.16 ($\text{M}+\text{H}^+$).

5-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-*n*-propylphenyl)pentan-1-ol (3l). Yield 64 %. mp 83 °C IR 2933, 2362, 1594, 1447, 1342, 1242, 1066 ^1H -NMR (d_4 -MeOH) 8.50 (1 H, s), 7.50–7.48 (4 H, m), 7.28–7.25 (4 H, m), 7.21–7.20 (2 H, m), 7.15–7.10 (4 H, m), 4.56–4.55 (1 H, m), 3.44 (2 H, d, $J = 12.59$), 2.94–2.87 (4 H, m), 2.81–2.76 (1 H, m), 2.54–2.52 (1 H, m), 1.75–1.58 (10 H, m), 1.44–1.27 (2 H, m), 0.91–0.88 (3 H, m) ^{13}C -

NMR (d_4 -MeOH) 147.02, 143.36, 142.79, 138.87, 129.47, 129.29, 129.03, 127.51, 127.38, 126.94, 126.86, 79.69, 74.46, 53.69, 42.78, 39.24, 38.57, 25.68, 25.32, 24.98, 23.93, 13.94 LC/MS-MS 472.23 ($M+H^+$).

5-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-*iso*-propylphenyl)pentan-1-ol (3m). Yield 68 %. mp 82 °C IR 3337, 2956, 2298, 1597, 1447, 1385, 1179 1H -NMR ($CDCl_3$) 8.40 (1 H, s), 7.49 (2 H, d, $J = 7.54$), 7.30–7.23 (6 H, m), 7.19–7.17 (4 H, m), 4.66–4.63 (1 H, m), 3.47–3.45 (2 H, m), 2.90–2.86 (3 H, m), 2.63–2.59 (3 H, m), 2.21–2.17 (2 H, m), 1.82–1.68 (4 H, m), 1.59 (2 H, d, $J = 13.79$). 1.51–1.41 (2 H, m), 1.23 (6 H, d, $J = 6.92$) ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) 167.61, 148.08, 145.45, 142.05, 128.34, 126.71, 126.45, 125.82, 125.56, 78.82, 73.46, 42.43, 38.05, 33.79, 24.02, 23.55, 23.05 LC/MS-MS 472.38 ($M+H^+$).

5-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)-piperidin-1-yl)-1-(4-*n*-butylphenyl)pentan-1-ol (3n). Yield 71 %. IR 2930, 2362, 1592, 1448, 1343, 1066 1H -NMR (d_4 -MeOH) 8.34 (1 H, s), 7.51 (4 H, d, $J = 8.30$), 7.31–7.27 (4 H, m), 7.23 (2 H, d, $J = 8.04$), 7.19–7.12 (4 H, m), 4.58 (1 H, t, $J = 6.20$), 3.49 (2 H, d, $J = 12.36$), 3.02–2.79 (5 H, m), 2.58 (2 H, t, $J = 7.72$), 1.83–1.66 (8 H, m), 1.60–1.48 (2 H, m), 1.31–1.29 (4 H, m), 0.92 (3 H, t, $J = 7.32$) ^{13}C -NMR (d_4 -MeOH) 166.41, 145.71, 142.05, 141.77, 127.99, 127.80, 126.29, 125.69, 125.63, 78.43, 73.21, 52.43, 41.42, 37.96, 34.89, 33.65, 23.67, 22.64, 21.94, 12.89 LC/MS-MS 486.20 ($M+H^+$).

5-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)-piperidin-1-yl)-1-(4-*iso*-butylphenyl)pentan-1-ol (3o). Yield 68 %. mp 75 °C IR 2952, 2504, 1593, 1447, 1345, 1186, 1067 1H -NMR (d_4 -MeOH) 8.36 (1 H, s), 7.53–7.50 (4 H, m), 7.31–7.27 (4 H, m), 7.24 (2 H, d, $J = 8.02$), 7.19–7.16 (2 H, m), 7.11 (2 H, d, $J = 8.11$), 4.59 (1 H, t, $J = 5.99$), 3.49 (2 H, d, $J = 12.54$), 3.03–2.80 (5 H, m), 2.44 (2 H, d, $J = 7.18$), 1.86–1.67 (9 H, m), 1.50–1.29 (2 H, m), 0.88 (6 H, d, $J = 6.63$) ^{13}C -NMR (d_4 -MeOH) 147.12, 143.58, 141.96, 130.10, 129.20, 127.69, 127.10, 126.90, 79.84, 74.61, 53.88, 46.11, 42.82, 39.34, 31.51, 25.07, 24.06, 22.70 LC/MS-MS 486.27 ($M+H^+$).

5-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)-piperidin-1-yl)-1-(4-*tert*-butylphenyl)pentan-1-ol (3p). Yield 58 %. mp 88 °C IR 2950, 2359, 1597, 1447, 1345, 1033 1H -NMR (d_4 -MeOH) 8.46 (1 H, s), 7.52–7.50 (4 H, m), 7.36 (2 H, d, $J = 8.43$), 7.31–7.25 (6 H, m), 7.19–7.16 (2 H, m), 4.60 (1 H, t, $J = 6.84$), 3.49 (2 H, d, $J = 12.54$), 3.02–2.94 (4 H, m), 2.86–2.80 (1 H, m), 1.84–1.67 (8 H, m), 1.49–1.32 (2 H, m), 1.29 (9 H, s) ^{13}C -NMR (d_4 -MeOH) 153.94, 149.62, 145.67, 131.73, 130.23, 130.19, 129.60, 129.36, 129.33, 128.74, 82.38, 77.04, 56.43, 45.35, 41.83, 37.85, 34.37, 27.61, 26.54 LC/MS-MS 486.27 ($M+H^+$).

4-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-phenylbutan-1-ol (3q). Yield 76 %. mp 94 °C IR 2778, 2361, 2339, 1595, 1448, 1356, 1064 1H -NMR (d_4 -MeOH) 8.53 (1 H, s), 7.51 (4 H, d, $J = 7.56$), 7.36–7.23 (9 H, m), 7.17 (2 H, d, $J = 7.29$), 4.68–4.66 (1 H, m), 3.45–3.44 (2 H, m), 3.02–2.99 (2 H, m), 2.92–2.78 (3 H, m), 1.84–1.67 (8 H, m) [Lit. 200 MHz, $CDCl_3$: 7.67–7.11 (15 H, m), 4.60 (1 H, m), 3.43 (1 H, d, $J = 7.00$), 3.12 (1 H, d, $J = 11.00$), 2.94 (1 H, d, $J = 11.00$), 2.51–2.34 (5 H, m), 2.15–1.74 (4 H, m), 1.62–1.44 (4 H, m)]¹⁴ ^{13}C -NMR (d_4 -MeOH) 147.21, 145.98, 129.43, 129.17, 128.46, 127.65, 127.09, 126.91, 79.89, 74.27, 54.03, 53.91, 43.05, 37.21, 25.57, 22.08, 21.89 LC/MS-MS 416.21 ($M+H^+$).

4-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-methylphenyl)butan-1-ol (3r). Yield 45 %. mp 97 °C IR 2355, 1595, 1447, 1356, 1063 1H -NMR (d_4 -MeOH) 8.54 (1 H, s), 7.52 (4 H, d, $J = 7.90$), 7.32–7.29 (4 H, m), 7.24 (2 H, d, $J = 8.00$), 7.20–7.14 (4 H, m), 4.65–4.63 (1 H, m), 3.48–3.45 (2 H, m), 3.04–3.00 (2 H, m), 2.94–

2.79 (3 H, m), 2.31 (3 H, s), 1.83–1.68 (8 H, m) ^{13}C -NMR (d_4 -MeOH) 170.06, 147.18, 142.87, 138.23, 130.02, 129.18, 127.66, 127.09, 126.89, 79.89, 74.14, 54.03, 53.91, 43.02, 37.13, 25.60, 22.08, 21.89, 21.12 LC/MS-MS 430.14 ($\text{M}+\text{H}^+$).

4-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-ethylphenyl)butan-1-ol (3s). Yield 41 %. mp 99 °C IR 2959, 1596, 1490, 1447, 1344, 1066 ^1H -NMR (d_4 -MeOH) 8.55 (1 H, s), 7.52 (4 H, d, $J = 7.83$), 7.31–7.25 (6 H, m), 7.19–7.17 (4 H, m), 4.65–4.63 (1 H, m), 3.41–3.36 (2 H, m), 2.95–2.91 (2 H, m), 2.79–2.76 (3 H, m), 2.65–2.60 (2 H, m), 1.82–1.66 (8 H, m), 1.21 (3 H, t, $J = 7.61$) ^{13}C -NMR (d_4 -MeOH) 170.26, 147.31, 144.78, 143.23, 143.21, 129.17, 128.88, 127.63, 127.13, 127.01, 79.97, 74.28, 74.17, 58.31, 54.21, 54.08, 43.36, 37.38, 29.56, 25.82, 22.39, 22.19, 16.29 LC/MS-MS 444.28 ($\text{M}+\text{H}^+$).

4-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-*n*-propylphenyl)butan-1-ol (3t). Yield 76 %. mp 104 °C IR 2933, 2363, 1593, 1491, 1447, 1342, 1065 ^1H -NMR (d_4 -MeOH) 8.56 (1 H, s), 7.52 (4 H, d, $J = 7.74$), 7.31–7.25 (6 H, m), 7.19–7.15 (4 H, m), 4.64–4.63 (1 H, m), 3.38–3.32 (2 H, m), 2.90–2.86 (2 H, m), 2.78–2.70 (3 H, m), 2.59–2.56 (2 H, m), 1.78–1.60 (8 H, m), 0.93 (3 H, t, $J = 7.35$) ^{13}C -NMR (d_4 -MeOH) 147.35, 143.27, 143.03, 129.49, 129.12, 127.57, 127.11, 126.91, 79.98, 74.20, 58.38, 54.26, 54.12, 43.51, 38.71, 25.90, 25.79, 22.31, 14.06 LC/MS-MS 460.23 ($\text{M}+\text{H}^+$).

4-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-*iso*-propylphenyl)butan-1-ol (3u). Yield 69 %. mp 173 °C IR 2959, 2363, 1606, 1446, 1327, 1176, 1071 ^1H -NMR (d_4 -MeOH) 8.52 (1 H, s), 7.51 (4 H, d, $J = 7.62$), 7.31–7.26 (6 H, m), 7.21–7.16 (4 H, m), 4.65–4.63 (1 H, m), 3.47–3.45 (2 H, m), 3.04–3.01 (2 H, m), 2.94–2.78 (4 H, m), 1.83–1.68 (8 H, m), 1.22 (6 H, t, $J = 6.93$) ^{13}C -NMR (d_4 -MeOH) 149.42, 147.18, 143.27, 129.18, 127.67, 127.41, 127.08, 126.97, 79.86, 74.13, 53.97, 53.87, 49.01, 42.97, 37.06, 35.10, 25.52, 24.46, 22.01 LC/MS-MS 458.13 ($\text{M}+\text{H}^+$).

4-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-*n*-butylphenyl)butan-1-ol (3v). Yield 65 %. mp 175 °C IR 2932, 2366, 1596, 1448, 1342, 1065 ^1H -NMR (d_4 -MeOH) 8.54 (1 H, s), 7.51 (4 H, d, $J = 7.48$), 7.30–7.24 (6 H, m), 7.18–7.14 (4 H, m), 4.64–4.62 (1 H, m), 3.41–3.35 (2 H, m), 2.93–2.90 (2 H, m), 2.80–2.74 (3 H, m), 2.60–2.57 (2 H, m), 1.81–1.65 (8 H, m), 1.60–1.54 (2 H, m), 1.37–1.32 (2 H, m), 0.92 (3 H, t, $J = 7.40$) ^{13}C -NMR (d_4 -MeOH) 147.27, 143.29, 143.18, 129.45, 129.14, 127.61, 127.10, 126.92, 85.09, 79.96, 74.27, 54.08, 43.34, 37.33, 36.27, 35.01, 31.79, 25.81, 23.31, 22.37, 19.23, 14.27 LC/MS-MS 472.20 ($\text{M}+\text{H}^+$).

4-(4'-(Hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)-1-(4-*iso*-butylphenyl)butan-1-ol (3w). Yield 68 %. mp 177 °C IR 2950, 2361, 1595, 1447, 1328, 1171, 1067 ^1H -NMR (d_4 -MeOH) 8.54 (1 H, s), 7.52–7.50 (4 H, d, $J = 7.42$), 7.30–7.24 (6 H, m), 7.18–7.15 (2 H, m), 7.13–7.11 (2 H, m), 4.65–4.62 (1 H, m), 3.42–3.38 (2 H, m), 2.96–2.93 (2 H, m), 2.83–2.74 (3 H, m), 2.45 (2 H, d, $J = 7.18$), 1.86–1.66 (9 H, m), 0.88 (6 H, d, $J = 6.63$) ^{13}C -NMR (d_4 -MeOH) 147.29, 143.32, 142.10, 130.18, 129.17, 127.64, 127.12, 126.81, 79.95, 74.27, 58.25, 54.15, 46.12, 43.29, 37.29, 31.52, 25.76, 22.71, 22.32 LC/MS-MS 472.34 ($\text{M}+\text{H}^+$).

4-*tert*-Butylphenyl-6-bromohexanoate (4a). Yield 61 %. ^1H -NMR (CDCl_3) 7.41–7.40 (2 H, d, $J = 8.59$), 7.03–7.02 (2 H, d, $J = 8.77$), 3.47–3.44 (2 H, t, $J = 6.72$), 2.61–2.58 (2 H, t, $J = 7.38$), 1.98–1.92 (2 H, m), 1.84–1.78

(2 H, m), 1.63–1.59 (2 H, m), 1.34 (9 H, s) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 172.06, 148.59, 148.36, 126.31, 120.84, 77.33, 77.06, 76.82, 34.49, 34.17, 33.43, 32.41, 31.44, 27.64, 24.12.

***N*-(4-*tert*-Butylphenyl)-6-bromohexan amide (4b).** Yield 71 %. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 7.43–7.41 (2 H, d, $J = 8.59$), 7.34–7.32 (2 H, d, $J = 8.58$), 3.43–3.40 (2 H, t, $J = 6.70$), 2.38–2.25 (2 H, t, $J = 7.38$), 1.93–1.87 (2 H, m), 1.79–1.73 (2 H, m), 1.56–1.50 (2 H, m), 1.30 (9 H, s) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 170.95, 147.37, 135.09, 125.80, 119.72, 38.74, 37.37, 33.53, 32.43, 31.34, 27.72, 24.70.

4-*tert*-Butylphenyl-6-(4'-(hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)hexanoate (5a). Yield 52 %. IR 3398, 2962, 2359, 1749, 1591, 1509, 1448, 1347, 1207, 1172, 1147, 1108, 1017, 951, 839, 749, 702 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 8.46 (1 H, s), 7.54–7.53 (4 H, m), 7.41–7.39 (2 H, m), 7.30–7.29 (4 H, m), 7.18–7.17 (2 H, m), 6.99–6.98 (2 H, m), 3.50 (2 H, s), 3.04–2.82 (5 H, m), 2.60–2.59 (2 H, m), 1.83–1.70 (8 H, m), 1.47 (2 H, s), 1.30 (9 H, s) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 173.82, 169.06, 169.02, 149.95, 147.27, 129.25, 127.76, 127.36, 127.12, 122.12, 79.88, 53.77, 42.93, 35.38, 34.68, 31.94, 27.74, 27.14, 25.35, 24.85, 24.41, 24.03, 23.82 LC/MS-MS 514.25 ($\text{M}+\text{H}^+$).

***N*-(4-*tert*-Butylphenyl)-6-(4-(hydroxydiphenylmethyl)piperidin-1-yl)hexan amide (5b).** Yield 36 %. IR 3286, 2959, 1662, 1598, 1537, 1448, 1346, 1111, 1031, 953, 839, 749, 702 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 8.44 (1 H, s), 7.53–7.52 (4 H, d, $J = 7.36$), 7.46–7.44 (2 H, d, $J = 8.70$), 7.34–7.28 (6 H, m), 7.19–7.16 (2 H, t, $J = 7.35$), 3.63 (1 H, s), 3.53–3.51 (2 H, m), 3.07–2.99 (4 H, m), 2.87–2.81 (1 H, m), 2.41–2.38 (2 H, t, $J = 7.16$), 1.78–1.71 (8 H, m), 1.46–1.43 (2 H, m), 1.30 (9 H, s) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 174.07, 148.32, 147.13, 129.20, 127.69, 127.11, 126.58, 121.09, 42.88, 42.85, 37.31, 35.25, 31.82, 27.22, 27.18, 26.06, 26.02, 24.90 LC/MS-MS 513.27 ($\text{M}+\text{H}^+$).

5-Bromo-1-(4-*tert*-butylphenyl)hexan-1-ol (6a). Yield 74 %. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{d}_4\text{-MeOH}$) 7.26–7.24 (2 H, d, $J = 7.85$), 7.13–7.12 (2 H, d, $J = 7.81$), 4.47–4.44 (1 H, t, $J = 6.80$), 3.27–3.24 (2 H, t, $J = 6.72$), 2.43–2.39 (1 H, m), 1.74–1.56 (4 H, m), 1.34–1.33 (4 H, m), 1.22 (9 H, s) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 150.11, 141.63, 125.41, 125.08, 73.89, 38.49, 34.31, 33.64, 32.54, 31.26, 27.90, 24.86.

1-(5-Bromohexyl)-4-*tert*-butylbenzene (7a). To a mixture of indium(III) chloride (33 mg) and **6a** (920 mg) in dry dichloromethane chlorodiphenylsilane (1.2 mL) was added drop wise. After stirring at room temperature for 3 hours the solution was hydrolyzed with a little amount of water. Diethyl ether was added, the organic layer separated and the water phase extracted with diethyl ether two times. The combined organic layers were dried, the solvent removed under reduced pressure and the raw product was purified by column chromatography (ethyl acetate/n-hexane: 1/12, followed by pure hexane). Yield 23 %. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{d}_4\text{-MeOH}$) 7.26–7.24 (2 H, d, $J = 8.27$), 7.06–7.05 (2 H, d, $J = 8.26$), 3.34–3.31 (2 H, t, $J = 6.83$), 2.55–2.52 (2 H, t, $J = 7.88$), 1.82–1.78 (2 H, m), 1.59–1.55 (2 H, m), 1.43–1.38 (2 H, m), 1.34–1.30 (2 H, m), 1.27 (9 H, s) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 148.33, 139.38, 127.97, 125.08, 35.23, 34.28, 33.78, 32.73, 31.41, 31.18, 28.45, 28.02.

(1-(6-(4-*tert*-Butylphenyl)hexyl)piperidin-4-yl)diphenylmethanol (8a). Yield 40 %. IR 2933, 2363, 1662, 1596, 1491, 1447, 1343, 1172, 1067, 955, 832, 749, 702 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 7.46–7.45 (4 H, d, $J = 8.49$), 7.26–7.22 (6 H, t, $J = 8.45$), 7.14–7.11 (2 H, t, $J = 7.31$), 7.05–7.03 (2 H, d, $J = 8.26$), 3.43–3.41 (2 H, d, $J = 11.05$), 2.81–2.77 (2 H, m), 2.58–2.55 (2 H, m), 2.52–2.49 (2 H, t, $J = 7.85$), 2.15–2.13 (2 H, m), 1.68–1.67 (2 H, m),

1.58–1.55 (4 H, m), 1.31–1.29 (4 H, m), 1.27 (9 H, s) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 148.45, 145.48, 139.22, 128.27, 127.96, 126.65, 125.54, 125.12, 78.78, 52.52, 52.5, 52.46, 52.45, 45.38, 42.50, 35.13, 34.30, 31.39, 31.09, 28.72, 26.79, 23.76, 23.31, 23.27 LC/MS-MS 485.00 ($\text{M}+\text{H}^+$).

1-(4-*iso*-Butylphenyl)-5-(piperidin-1-yl)pentan-1-one (9a). Yield 78 %. mp 143 °C IR 2955, 2869, 1739, 1676, 1604, 1453, 1368, 1273, 1184, 1022 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 7.93–7.91 (2 H, d, $J = 8.31$), 7.30–7.28 (2 H, d, $J = 8.25$), 3.13–3.07 (4 H, m), 2.56–2.55 (2 H, d, $J = 7.23$), 1.95–1.68 (12 H, m), 1.35–1.32 (1 H, m), 0.92–0.91 (6 H, d, $J = 6.63$) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 201.45, 149.18, 136.01, 130.53, 129.21, 64.32, 64.29, 58.04, 54.22, 52.98, 46.31, 38.41, 31.35, 24.60, 24.27, 22.82, 22.69, 22.15, 16.65, 16.60 LC/MS-MS 302.93 ($\text{M}+\text{H}^+$).

1-(4-*iso*-Butylphenyl)-5-(4-methylpiperidin-1-yl)pentan-1-one (9b). Yield 21 %. IR 2956, 2361, 1679, 1605, 1457, 1414, 1369, 1336, 1182, 977, 855, 759 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 7.88–7.86 (2 H, d, $J = 8.24$), 7.26–7.24 (2 H, d, $J = 8.19$), 3.52–3.51 (2 H, m), 3.06–3.03 (2 H, t, $J = 6.84$), 2.99–2.96 (2 H, m), 2.64–2.54 (4 H, m), 1.93–1.75 (9 H, m), 1.63–1.62 (1 H, m), 1.04–1.02 (3 H, d, $J = 6.37$), 0.93–0.92 (6 H, d, $J = 6.62$) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 199.10, 147.76, 134.45, 129.31, 127.96, 45.36, 37.37, 30.07, 23.41, 22.31, 21.19 LC/MS-MS 315.94 ($\text{M}+\text{H}^+$).

1-(4-*iso*-Butylphenyl)-5-(4-hydroxypiperidin-1-yl)pentan-1-one (9c). Yield 68 %. IR 3345, 2954, 2495, 1735, 1679, 1605, 1465, 1414, 1372, 1239, 1181, 1042, 978, 852, 763 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 7.90–7.88 (2 H, d, $J = 8.27$), 7.26–7.25 (2 H, d, $J = 8.20$), 3.93 (1 H, s), 3.38 (2 H, s), 3.19–3.05 (5 H, m), 2.52–2.51 (2 H, d, $J = 7.21$), 2.06–2.03 (2 H, m), 1.89–1.73 (8 H, m), 0.88–0.87 (6 H, d, $J = 6.63$) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 201.44, 149.14, 136.02, 130.54, 129.23, 71.13, 57.71, 46.32, 38.47, 31.83, 31.35, 24.77, 22.72, 22.13, 20.94 LC/MS-MS 318.11 ($\text{M}+\text{H}^+$).

5-(4-Benzylpiperidin-1-yl)-1-(4-*iso*-butylphenyl) pentan-1-one (9d). Yield 34 %. mp 143 °C IR 3454, 2931, 1682, 1605, 1455, 1241, 1112 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 7.86–7.84 (2 H, d, $J = 8.26$), 7.27–7.10 (7 H, m), 7.95–7.92 (2 H, m), 2.86 (2 H, d, $J = 11.65$), 2.51–2.50 (4 H, d, $J = 7.21$), 2.33–2.30 (2 H, m), 1.90–1.80 (3 H, m), 1.80–1.69 (2 H, m), 1.61–1.46 (5 H, m), 1.32–1.20 (2 H, m), 0.89–0.88 (6 H, d, $J = 6.62$) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 199.89, 147.24, 140.66, 134.76, 129.18, 129.03, 128.05, 127.98, 125.66, 77.01, 70.54, 58.67, 53.90, 45.30, 43.18, 38.25, 37.91, 32.15, 30.02, 26.69, 22.52, 22.27 LC/MS-MS 392.07 ($\text{M}+\text{H}^+$).

1-(4-*iso*-Butylphenyl)-5-(piperidin-1-yl)pentan-1-ol (10a). Yield 94 %. mp 64 °C IR 3386, 2952, 1587, 1446, 1347, 1018 $^1\text{H-NMR}$ ($d_4\text{-MeOH}$) 8.55 (1 H, s), 7.25–7.24 (2 H, d, $J = 8.01$), 7.12–7.10 (2 H, d, $J = 8.36$), 4.60–4.58 (1 H, m), 3.31–2.98 (3 H, m), 2.85–2.82 (2 H, m), 2.46–2.45 (2 H, d, $J = 7.18$), 1.87–1.61 (10 H, m), 1.48–1.28 (3 H, m), 0.90–0.88 (2 H, d, $J = 6.62$) $^{13}\text{C-NMR}$ ($d_4\text{-MeOH}$) 170.38, 143.64, 141.89, 130.07, 126.92, 74.61, 58.69, 54.46, 46.13, 31.50, 25.46, 25.43, 24.26, 24.15, 23.40, 22.70 LC/MS-MS 306.92 ($\text{M}+\text{H}^+$).

1-(4-*iso*-Butylphenyl)-5-(4-methylpiperidin-1-yl)pentan-1-ol (10b). Yield 57 %. IR 3349, 2953, 2667, 1717, 1594, 1458, 1177, 1051, 948, 848 $^1\text{H-NMR}$ ($d_4\text{-MeOH}$) 7.23–7.21 (2 H, d, $J = 8.01$), 7.11–7.09 (2 H, d, $J = 7.82$), 3.54–3.53 (2 H, m), 2.92–2.90 (2 H, m), 2.56–2.54 (2 H, m), 2.45–2.44 (2 H, d, $J = 7.15$), 1.87–1.70 (10 H, m), 1.50–1.39 (3 H, m), 1.02–1.01 (3 H, d, $J = 6.47$), 0.89–0.88 (6 H, d, $J = 6.61$) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 141.75, 141.05, 129.21, 125.55, 73.65, 57.35, 52.99, 45.08, 37.98, 30.19, 23.04, 22.36, 20.97 LC/MS-MS 318.04 ($\text{M}+\text{H}^+$).

1-(4-*iso*-Butylphenyl)-5-(4-hydroxypiperidin-1-yl)pentan-1-ol (10c). Yield 47 %. IR 3357, 2950, 2868, 2670, 1466, 1383, 1040, 973, 849, 802, 609 ¹H-NMR (CDCl₃) 7.28–7.27 (2 H, d, *J* = 8.01), 7.14–7.13 (2 H, d, *J* = 8.01), 4.64–4.62 (1 H, t, *J* = 7.19), 4.10–3.56 (2 H, m), 3.37 (1 H, s), 3.25 (1 H, s), 3.09–3.06 (2 H, t, *J* = 8.17), 2.48–2.47 (2 H, d, *J* = 7.17), 2.12–1.77 (10 H, m), 1.52–1.38 (2 H, m), 0.91–0.90 (6 H, d, *J* = 6.62) ¹³C-NMR (CDCl₃) 143.61, 141.94, 130.10, 126.93, 74.62, 52.21, 46.13, 39.39, 31.51, 30.98, 24.07, 22.72 LC/MS-MS 319.93 (M+H⁺).

5-(4-Benzylpiperidin-1-yl)-1-(4-*iso*-butylphenyl) pentan-1-ol (10d). Yield 45 %. mp 64 °C IR 2929, 2361, 1454, 1275 ¹H-NMR (d₄-MeOH) 7.30–7.17 (7 H, m), 7.12–7.10 (2 H, d, *J* = 7.99), 7.19–7.12 (4 H, m), 4.61–4.59 (1 H, m), 3.50–3.49 (2 H, m), 3.03–2.87 (4 H, m), 2.62–2.61 (2 H, d, *J* = 7.17), 2.62–2.61 (2 H, m), 1.89–1.71 (8 H, m), 1.52–1.47 (4 H, m), 0.89–0.88 (2 H, d, *J* = 6.05) ¹³C-NMR (d₄-MeOH) 143.59, 141.95, 140.50, 130.19, 130.10, 129.50, 127.40, 126.91, 74.61, 46.12, 39.36, 31.51, 25.10, 24.07, 22.71 LC/MS-MS 394.24 (M+H⁺).

1-(4-*iso*-Butylphenyl)-5-morpholinopentan-1-one (11a). Yield 63 %. IR 2867, 1681, 1606, 1466, 1353, 1251, 1182, 1114, 988, 949, 861, 734 ¹H-NMR (CDCl₃) 7.85–7.83 (2 H, d, *J* = 8.21), 7.22–7.20 (2 H, d, *J* = 8.14), 3.88–3.86 (4 H, t, *J* = 4.76), 3.00–2.98 (2 H, t, *J* = 6.22), 2.90 (4 H, s), 2.79–2.76 (2 H, t, *J* = 7.28), 2.52–2.50 (2 H, d, *J* = 7.19), 1.89–1.87 (1 H, m), 1.76–1.75 (4 H, m), 0.89–0.88 (6 H, d, *J* = 6.62) ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.68, 147.25, 134.66, 129.14, 127.88, 70.57, 66.73, 58.56, 53.58, 45.24, 38.06, 29.96, 25.97, 22.02, 22.14 LC/MS-MS 304.12 (M+H⁺).

1-(4-*iso*-Butylphenyl)-5-morpholinopentan-1-ol (12a). Yield 26 %. IR 3422, 2952, 2868, 2465, 1722, 1599, 1514, 1466, 1366, 1264, 1105, 977, 849, 803, 620 ¹H-NMR (CDCl₃) 7.26–7.24 (2 H, d, *J* = 8.00), 7.13–7.11 (2 H, d, *J* = 8.03), 4.62–4.60 (1 H, m), 3.89 (4 H, s), 3.20 (4 H, s), 3.06–3.03 (2 H, t, *J* = 8.31), 2.47–2.45 (2 H, d, *J* = 7.18), 1.84–1.74 (5 H, m), 1.49–1.35 (2 H, m), 0.90–0.88 (6 H, d, *J* = 6.63) ¹³C-NMR (CDCl₃) 143.62, 141.94, 130.10, 126.92, 74.63, 71.51, 65.28, 58.56, 53.25, 46.13, 45.60, 39.43, 31.51, 24.81, 24.00, 22.71 LC/MS-MS 306.08 (M+H⁺).

1-(5-(4-*iso*-Butylphenyl)-5-oxopentyl)piperidin-4-one (13a). Yield 3 %. IR 2955, 2869, 2808, 1716, 1678, 1606, 1570, 1466, 1307, 1275, 1183, 954, 846, 796 ¹H-NMR (CDCl₃) 7.93–7.90 (2 H, m), 7.30–7.28 (2 H, m), 2.79–2.76 (2 H, t, *J* = 6.16), 2.56–2.42 (9 H, m), 1.93–1.90 (1 H, m), 1.78–1.60 (7 H, m), 0.92–0.91 (6 H, d, *J* = 6.63) ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.42, 129.34, 127.99, 70.48, 56.68, 52.04, 45.41, 39.37, 37.67, 30.04, 22.27, 21.65 LC/MS-MS 316.15 (M+H⁺).

5-(3-(Hydroxydiphenylmethyl)pyrrolidin-1-yl)-1-(4-*iso*-butylphenyl)pentan-1-one (15a). Yield 36 %. IR 2957, 1679, 1605, 1448, 1367, 1182, 984, 751, 700 ¹H-NMR (CDCl₃) 7.79–7.77 (2 H, d, *J* = 8.15), 7.43–7.40 (4 H, t, *J* = 8.27), 7.27–7.22 (4 H, m), 7.18–7.14 (4 H, m), 3.75–3.72 (1 H, m), 3.07–2.92 (8 H, m), 2.49–2.47 (2 H, d, *J* = 7.19), 2.16–1.99 (2 H, m), 1.86–1.84 (1 H, m), 1.72–1.69 (4 H, m), 0.87–0.85 (6 H, d, *J* = 6.62) ¹³C-NMR (CDCl₃) 199.11, 147.86, 145.41, 134.32, 129.37, 128.65, 128.46, 127.97, 127.91, 127.04, 125.51, 125.45, 78.48, 55.24, 54.54, 45.61, 45.36, 37.28, 30.07, 25.56, 25.13, 22.30, 20.89 LC/MS-MS 470.10 (M+H⁺).

5-(3-(Hydroxydiphenylmethyl)pyrrolidin-1-yl)-1-(4-*iso*-butylphenyl)pentan-1-ol (16a). Yield 48 %. IR 3351, 2954, 2373, 1597, 1448, 1338, 1176, 1107, 1067, 1034, 850, 750, 703 ¹H-NMR (CDCl₃) 7.45–7.42 (4 H, t, *J* = 7.67), 7.29–7.24 (4 H, m), 7.19–7.16 (4 H, m), 7.08–7.06 (2 H, d, *J* = 7.97), 4.62–4.59 (1 H, m), 3.77–3.74 (1 H, m), 2.91–2.88 (6 H, m), 2.43–2.42 (2 H, d, *J* = 7.14), 2.19–2.15 (2 H, m), 1.83–1.79 (1 H, m), 1.76–1.64 (4 H, m), 1.46–1.35 (2 H, m), 0.87–0.86 (6 H, d, *J* = 6.61) ¹³C-NMR (CDCl₃) 145.66, 141.83, 141.02, 129.20, 128.63, 128.47, 127.19, 127.07, 125.58, 125.52, 125.49, 78.49, 73.66, 61.84, 54.56, 54.38, 45.09, 37.95, 30.20, 25.63, 25.32, 22.91, 22.37 LC/MS-MS 472.20 (M+H⁺).

Acknowledgment

We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) for the grants given to Marcel Holzer and Sigrid Ziegler (KFO129) and the Fonds der Chemischen Industrie for financial support. Furthermore we thank Susanne Reinhardt for the synthesis of compounds **9a**, **9d**, **10a** and **10d**.

References

1. Chisari, F.V., Unscrambling hepatitis C virus-host interactions. *Nature*, 2005. 436, 930-2.
2. WHO, Annex Table 2: deaths by cause, sex and mortality stratum in WHO regions, estimates for 2001. www.who.int/entity/whr/2002/en/whr2002_annex2002.pdf (accessed 01.2008). 2002.
3. VanCompernelle, S.E., A.V. Wiznycia, J.R. Rush, M. Dhanasekaran, P.W. Baures, and S.C. Todd, Small molecule inhibition of hepatitis C virus E2 binding to CD81. *Virology*, 2003. 314, 371-80.
4. Ziegler, S., Kronenberger B., Albrecht B., Kaul A., Gamer A.-L., Klein C. D., Hartmann R. W., Development and Evaluation of a FACS-Based Medium Throughput Assay for HCV Entry Inhibitors. *J. Biomol. Scr.*, 2009. soon to be published
5. Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A.J. Weiner, M. Houghton, D. Rosa, G. Grandi, and S. Abrignani, Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, 1998. 282, 938-41.
6. Carr, A., Clyde, R., (Richardson-Merrel Inc.) *DE. Patent 2506770*. 1975.
7. Pietschmann, T., A. Kaul, G. Koutsoudakis, A. Shavinskaya, S. Kallis, E. Steinmann, K. Abid, F. Negro, M. Dreux, F.L. Cosset, and R. Bartenschlager, Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103, 7408-13.
8. Koutsoudakis, G., A. Kaul, E. Steinmann, S. Kallis, V. Lohmann, T. Pietschmann, and R. Bartenschlager, Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol*, 2006. 80, 5308-20.

9. Lohmann, V., F. Korner, J. Koch, U. Herian, L. Theilmann, and R. Bartenschlager, Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, 1999. 285, 110-3.
10. Kato, T., T. Date, M. Miyamoto, A. Furusaka, K. Tokushige, M. Mizokami, and T. Wakita, Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology*, 2003. 125, 1808-17.
11. Zhang, W.C. and C.J. Li, A direct retro-barbier fragmentation. *J Org Chem*, 2000. 65, 5831-3.
12. Kawakita, T., Kuroita, T., Murozono, T., Hakira, H., Haga, H., Ito, K., Sonda, S., Kawahara, S., Asona, K., (Yoshitomi Pharmaceutical Industries) *US Patent 5864039*. 1999.
13. Wagner, P. J., Lindstrom, M. J., Sedon, J. H., Ward, D. R., *J. Am. Chem. Soc.* 1981, 103, 3842-9.
14. Zhang, R.X., [Study on plasma levels of vasoactive intestinal peptide (VIP) in patients with allergic rhinitis]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*, 1993. 28, 165-6, 187-8.
15. Lafite, P., F. Andre, D.C. Zeldin, P.M. Dansette, and D. Mansuy, Unusual regioselectivity and active site topology of human cytochrome P450 2J2. *Biochemistry*, 2007. 46, 10237-47.

4.4. Microwave-assisted synthesis of amino acid ester substituted benzoic acid amides: Potential inhibitors of human CD81-receptor HCV-E2 interaction

Marcel Holzer, Sigrid Ziegler, Bernd Kronenberger, Christian D. Klein, Rolf W. Hartmann

This manuscript has been published as an article in the
The Open Medicinal Chemistry Journal, 2008, 2, 21-25

Publikation IV.

Abstract

Results from our group showed benzyl salicylate to be a moderate inhibitor of the CD81-LEL–HCV-E2 interaction. To increase the biological activity, heterocyclic substituted benzoic acids were coupled to amino acid esters *via* microwave assisted DCC-reaction. The prepared compounds were tested for their inhibitory potency by means of a fluorescence labeled antibody assay system using Huh-7.5 cells.

Introduction

Recently the World Health Organization (WHO) estimated that 3 % of the world's population has been infected with the Hepatitis C Virus (HCV).¹ Infection with HCV is the most common cause of chronic hepatitis with frequent progression to liver cirrhosis and its sequelae.² Inhibition of the Hepatitis C Virus E2 glycoprotein (HCV-E2) binding to the *large extracellular loop* (LEL) of the human cell surface protein CD81, a member of the tetraspanin family, prevents infection of human hepatocytes, the HCV principal target cells.³ The aim of the present work was to prepare compounds which bind to CD81-LEL and therefore inhibit the CD81-LEL–HCV-E2 interaction.

This work was based on results recently achieved in our group.⁴ Briefly, we found benzyl salicylate (figure 1) to inhibit the CD81-LEL–HCV-E2 interaction (25 % at 50 μ M) as outcome of a virtual screening followed by biological testing. Several heterocyclic substituted benzoic acid amides were synthesized and tested for their biological activity. Some of the prepared compounds showed inhibition of the CD81-LEL–HCV-E2 interaction.

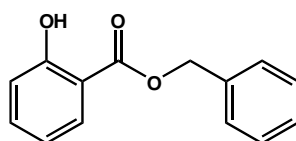


Figure 1: Benzyl salicylate.

Results and discussion

Structure modification. Based on the docking pose of benzyl salicylate into the published x-ray structure of CD81-LEL (pdb code: 1IV5),⁵ we assumed that an extension of the planar/aromatic ring system could increase the affinity to our intended binding site within a superficial cleft formed by two alpha-helices in the CD81-LEL structure. In order to maximize more specific hydrogen-bonding and electrostatic interactions with the target protein, we decided to introduce heterocyclic ring systems and amino acid moieties in opposite positions of an aromatic core structure. The aim of this work was therefore to prepare compounds of the general structure given in figure 2 and to determine their inhibition of the CD81-LEL–HCV-E2 interaction.

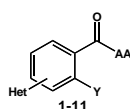
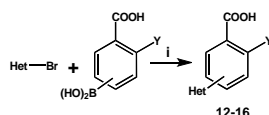


Figure 2. General structure of the synthesized benzoic acid amides (Het = Heterocycle, Y = -H, -OH, AA = L-alanine ethyl ester, L-phenylalanine ethyl ester, L-tryptophane methyl ester).

Syntheses and biological testing. In the first step of the preparation, starting from commercially available reagents, the bromo substituted aromatic heterocycles were coupled to the corresponding boronic acids with tetrakis(triphenylphosphine) palladium (0) as catalyst *via* a Suzuki coupling reaction (cf. scheme 1) in satisfying yields. The synthesized heterocyclic substituted carboxylic acids **12-16** as well as the applied bromo substituted heterocycles and boronic acids are shown in table 1.



Scheme 1. Reagents and conditions: (i) 10 ml EtOH + 15 ml 10 % Na₂CO₃-solution, Pd(PPh₃)₄, O₂-free, 90 °C over night (Y = -H, -OH).

Heterocycle	Boronic acid	Product
		12
		13
		14
		15
		16

Table 1. Suzuki coupling reactions of heterocycles and boronic acids leading to heterocyclic substituted carboxylic acids (**12-16**).

The desired amides **1-11** (table 2) were obtained in the second step by connecting the benzoic acids **12-16** to L-alanine ethyl ester, L-phenylalanine ethyl ester and L-tryptophane methyl ester using N,N'-dicyclohexyl carbodiimide (DCC) as coupling agent for microwave-assisted amide formation (cf. scheme 2).

Before we decided to apply microwave-assisted amide syntheses, activation of the carboxylic acids by means of thionyl chloride followed by addition of the corresponding amino acid esters was tried. This did not lead to the desired compounds.

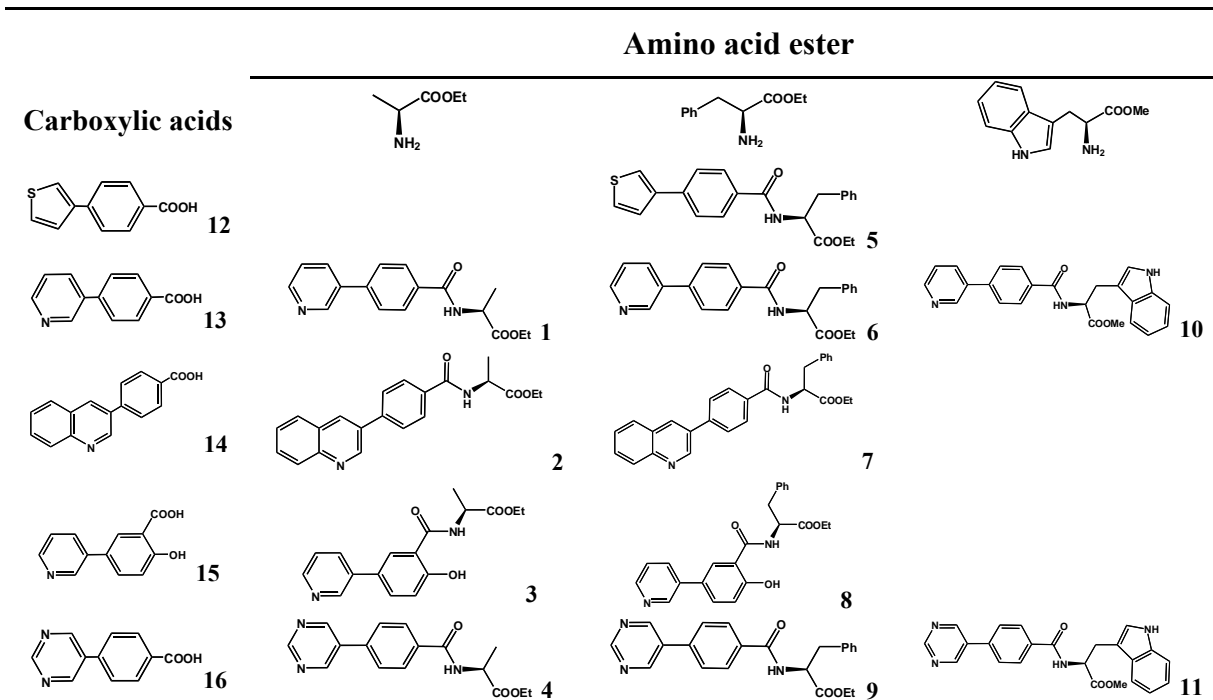


Table 2. Amino acid esters, carboxylic acids and the corresponding 'combinatorial' target compounds **1-11**.



Scheme 2. Reagents and conditions: (i) Dicyclohexyl carbodiimide, dimethoxyethane / dichloromethane (5/1), microwaves: 225 Watt, 135 °C, 5 bar, 10 minutes (Het = Heterocycle, AA = amino acid ester: L-alanine ethyl ester, L-phenylalanine ethyl ester, L-tryptophane methyl ester, Y = -H, -OH).

DCC coupling reaction under standard conditions was performed next leading to the desired amides in very poor yields. Therefore microwave-assisted DCC coupling reaction was tried to increase the yield of the desired products. This attempt finally led to the target compounds **1-11** in satisfying yields.

A medium throughput assay developed in our group⁶ was used to test the prepared compounds **1-11** for their biological activity. This assay is based on the procedure of Pileri *et al.*⁷ in which the inhibition of the interaction of the fluorescence-labeled CD81 antibody JS81 with Huh-7.5 cells caused by our compounds is determined by FACS. The synthesized compounds **1-11** showed no increased inhibition concerning the CD81-LEL-HCV-E2 interaction compared to the original hit compound benzyl salicylate.

Experimental section

General Procedure for the Suzuki Coupling Reaction. The boronic acid (1 equivalent) and the bromo substituted heterocycle (1 equivalent) were added to a mixture of 10 mL ethanol and 15 mL sodium carbonate solution (10 %). This solution was free from oxygen by evacuating and flushing with nitrogen several times. After addition of 4 mol % of tetrakis(triphenylphosphine) palladium (0) the mixture was stirred at 90 °C over night.

The remaining solid was filtered off at that temperature. Subsequently half of the solvent was removed under vacuum. The product precipitated after acidifying to pH 2 using formic acid. It was filtered off and dried under high vacuum.

General Procedure for the Formation of the Amides. The carboxylic acid was stirred with an equivalent amount of the amino acid ester and dicyclohexyl carbodiimide (1.2 equivalent) in the microwave oven (225 Watt, 135 °C, 5 bar, 10 minutes) using dry dichloromethane (4 mL) as solvent. After filtration the solvent was removed. Purification of the crude product was performed with column chromatography.

Biological Test. Huh-7.5 cells ($1 \cdot 10^5$) were incubated with 100 μ L of the potential inhibitor (50 μ M + 1 % DMSO) in 96 transwell plates for 10 minutes at room temperature. Next 4 μ L of the fluorescence-labeled CD81 antibody JS81 and 21 μ L of phosphate buffered saline buffer (PBS) were added and kept at room temperature for 10 minutes. After appending 125 μ L of PBS the cell suspension was incubated in the dark for 5 hours followed by FACS analysis.

Chemistry. Solvents and reagents were used as received from commercial distributors without further purification. Anhydrous reactions were conducted under a nitrogen atmosphere. Proton and carbon NMR spectra were recorded at a Bruker AM 500. The proton NMR spectra were recorded at 500 MHz, the carbon NMR spectra at 125 MHz. Chemical shifts δ are reported in ppm units. Molecular mass was determined by liquid chromatography

– tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using a TSQ Quantum from Thermo Finnigan equipped with an electro spray interface and connected to a Surveyor HPLC (Thermo Finnigan). Positive and negative ion mass spectra were recorded (mass range m/z 150–1500) in normal scan mode. Melting points were determined using a Stuart Scientific SMP3 melting point apparatus. IR measurements were performed on a Bruker Vector 33 at a frequency range from 4000–250 cm^{-1} . Wave numbers ν are reported in cm^{-1} . For flash chromatography Merck silica gel 35/40–63/70 was used. Microwave assisted synthesis was performed using a CEM DISCOVER microwave oven.

(S)-Ethyl 2-[4-(pyridin-3-yl)benzamide]propanoate (1). Yield 24 %. mp 118 °C IR 3330, 2930, 2851, 2478, 1745, 1606, 1479, 1437, 1210, 1170 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 8.75–8.74 (1 H, m), 8.52–51 (1 H, m), 7.90–7.88 (3 H, m), 7.60 (1 H, d, $J = 8.51$), 7.40–7.37 (1 H, m), 7.29–7.27 (1 H, m), 4.72–4.70 (1 H, m), 4.21–4.17 (2 H, q, $J = 7.25$), 1.48 (3 H, d, $J = 7.25$), 1.24 (3 H, t, $J = 7.25$) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 173.38, 166.86, 148.53, 147.70, 140.75, 135.86, 134.97, 127.97, 127.20, 123.95, 61.70, 33.70, 18.13, 14.00 LC/MS-MS 299.11 ($\text{M}+\text{H}^+$).

(S)-Ethyl 2-[4-(quinolin-3-yl)benzamido]propanoate (2). Yield 29 %. mp 142 °C IR 3356, 2985, 1742, 1638, 1532, 1439, 1205, 1172 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 9.35 (1 H, s), 8.81 (1 H, s), 8.25–8.20 (4 H, m), 8.14–8.09 (3 H, m), 7.99–7.94 (1 H, m), 7.85–7.80 (1 H, m), 4.84–4.77 (1 H, m), 4.42–4.38 (2 H, m), 1.72–1.69 (3 H, m), 1.47 (3 H, t, $J = 7.25$) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 174.42, 169.59, 150.22, 148.12, 141.95, 135.74, 134.85, 131.46, 129.72, 129.59, 129.54, 129.27, 128.99, 128.68, 128.45, 128.21, 62.41, 50.35, 17.28, 14.50 LC/MS-MS 349.05 ($\text{M}+\text{H}^+$).

(S)-Ethyl 2-[4-hydroxy-3-(pyridin-3-yl)benzamide]propanoate (3). Yield 14 %. IR 2926, 1738, 1642, 1541, 1472, 1376, 1294, 1205 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 9.01 (1 H, s), 8.67–8.66 (1 H, m), 8.40–8.39 (1 H, m), 8.29–8.27 (1 H, m), 7.91 (1 H, dd, $J = 8.51$), 7.84–7.80 (1 H, m), 7.70–7.67 (1 H, m), 7.24 (1 H, d, $J = 8.51$), 4.85–4.81 (1 H, m), 4.41–4.39 (2 H, m), 1.71 (3 H, d, $J = 7.25$), 1.45 (3 H, t, $J = 7.25$) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 174.31, 170.15, 161.51, 148.31, 147.98, 136.00, 133.44, 133.05, 129.48, 128.15, 125.43, 119.49, 117.49, 62.49, 50.02, 17.48, 14.47 LC/MS-MS 314.97 ($\text{M}+\text{H}^+$).

(S)-Ethyl 2-[4-(pyrimidin-5-yl)benzamido]propanoate (4). Yield 44 %. mp 124 °C IR 2930, 2475, 1741, 1625, 1550, 1415, 1213, 1161 $^1\text{H-NMR}$ ($d_4\text{-MeOH}$) 9.35 (1 H, s), 9.30 (2 H, s), 8.22 (2 H, d, $J = 8.55$), 8.02 (2 H, d, $J = 8.56$), 4.82–4.78 (1 H, m), 4.42–4.37 (2 H, m), 1.71 (3 H, d, $J = 7.57$), 1.46 (3 H, t, $J = 7.25$) $^{13}\text{C-NMR}$ ($d_4\text{-MeOH}$) 174.35, 169.36, 158.47, 156.30, 138.54, 135.71, 135.06, 129.66, 128.28, 62.41, 50.34, 17.25, 14.50 LC/MS-MS 300.02 ($\text{M}+\text{H}^+$).

(S)-Ethyl 3-phenyl-2-[4-(thiophen-3-yl)benzamido]propanoate (5). Yield 43 %. mp 160 °C IR 3345, 2997, 1748, 1634, 1517, 1178 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 7.76 (2 H, d, $J = 8.51$), 7.64 (2 H, d, $J = 8.51$), 7.54–7.53 (1 H, m), 7.42–7.41 (2 H, m), 7.31–7.25 (3 H, m), 7.17–7.15 (2 H, m), 5.11–5.07 (1 H, m), 4.23 (2 H, q, $J = 6.94$), 3.32–3.23 (2 H, m), 1.28 (3 H, t, $J = 7.25$) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 171.66, 166.38, 141.16, 139.07, 135.94, 132.32, 129.45, 128.58, 127.65, 127.14, 126.67, 126.47, 126.16, 121.61, 61.67, 53.56, 37.99, 14.17 LC/MS-MS 380.00 ($\text{M}+\text{H}^+$).

(S)-Ethyl 3-phenyl-2-[4-(pyridin-3-yl)benzamido]propanoate (6). Yield 11 %. mp 170 °C IR 3331, 2929, 1735, 1628, 1537, 1311, 1197 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.86 (1 H, s), 8.64–8.63 (1 H, m), 7.90–7.88 (1 H, m), 7.84 (2 H, d, *J* = 8.51), 7.64 (2 H, d, *J* = 8.51), 7.40–7.39 (1 H, m), 7.32–7.30 (2 H, m), 7.19–7.15 (3 H, m), 6.66–6.64 (1 H, m), 5.30 (2 H, s), 5.11–5.07 (1 H, m), 4.25–4.21 (2 H, m), 1.31–1.28 (3 H, m) LC/MS-MS 375.10 (M+H⁺).

(S)-Ethyl 3-phenyl-2-[4-(quinolin-3-yl)benzamido]propanoate (7). Yield 35 %. mp 77 °C IR 3324, 2929, 2851, 1741, 1626, 1572, 1529, 1208 ¹H-NMR (CDCl₃) 9.18 (1 H, s), 8.34–8.33 (1 H, m), 8.16–8.14 (1 H, d, *J* = 8.51), 7.91–7.88 (3 H, m), 7.79–7.73 (3 H, m), 7.61–7.59 (1 H, m), 7.32–7.28 (3 H, m), 7.18–7.17 (2 H, m), 6.71–6.69 (1 H, m), 5.12–5.09 (1 H, m), 4.25 (2 H, q, *J* = 6.94), 3.36–3.25 (2 H, m), 1.29 (3 H, t, *J* = 7.25) ¹³C-NMR (CDCl₃) 171.61, 166.25, 149.50, 147.77, 135.89, 133.66, 133.45, 132.66, 129.86, 129.44, 129.31, 128.61, 128.12, 127.94, 127.59, 127.21, 61.73, 53.62, 25.63, 14.16 LC/MS-MS 425.13 (M+H⁺).

(S)-Ethyl 2-[2-hydroxy-5-(pyridin-3-yl)benzamido]-3-phenylpropanoate (8). Yield 16 %. mp 176 °C IR 3325, 2928, 2851, 1744, 1625, 1572, 1244 ¹H-NMR (CDCl₃) 12.04 (1 H, s), 8.67 (1 H, s), 8.51–8.50 (1 H, m), 7.71–7.70 (1 H, m), 7.55–7.53 (1 H, dd, *J*₁ = 8.83, *J*₂ = 2.19), 7.41–7.40 (1 H, m), 7.30–7.27 (1 H, m), 7.25–7.21 (3 H, m), 7.11–7.09 (2 H, m), 7.02 (1 H, d, *J* = 8.83), 6.97 (1 H, d, *J* = 7.25), 4.98–4.94 (1 H, m), 4.17 (2 H, q, *J* = 7.25), 3.25–3.17 (2 H, m), 1.22 (3 H, t, *J* = 7.25) ¹³C-NMR (CDCl₃) 171.33, 169.11, 148.26, 147.82, 135.55, 133.97, 133.19, 129.35, 128.72, 127.43, 119.41, 114.56, 61.96, 33.95, 24.94, 14.14 LC/MS-MS 391.05 (M+H⁺).

(S)-Ethyl 3-phenyl-2-[4-(pyrimidin-5-yl)benzamido]propanoate (9). Yield 32 %. mp 129 °C IR 3269, 2928, 1738, 1652, 1530, 1414, 1349, 1192 ¹H-NMR (CDCl₃) 9.24 (1 H, s), 8.97 (2 H, s), 7.88 (2 H, d, *J* = 8.51), 7.65 (2 H, d, *J* = 8.51), 7.32 (3 H, m), 7.16–7.14 (2 H, m), 6.67–6.66 (1 H, m), 5.10–5.07 (1 H, m), 4.24 (2 H, q, *J* = 7.25), 3.34–3.24 (2 H, m), 1.41 (3 H, t, *J* = 7.25) ¹³C-NMR (CDCl₃) 171.55, 165.93, 158.06, 154.97, 137.55, 135.80, 134.42, 133.34, 129.41, 128.62, 128.16, 127.24, 61.79, 53.62, 37.90, 14.17 LC/MS-MS 376.08 (M+H⁺).

(S)-Methyl 3-(1*H*-indol-3-yl)-2-[4-(pyridin-3-yl) benzamido]propanoate (10). Yield 24 %. mp 96 °C IR 3266, 1737, 1642, 1530, 1435, 1215 ¹H-NMR (CDCl₃) 8.75 (1 H, s), 8.55 (1 H, s), 8.40 (1 H, s), 7.80–7.77 (1 H, m), 7.70 (2 H, d, *J* = 8.51), 7.49 (3 H, s), 7.31–7.27 (2 H, m), 7.12–7.09 (1 H, m), 7.03–7.00 (1 H, m), 6.95–6.94 (1 H, m), 6.70 (1 H, d, *J* = 7.57), 5.11–5.08 (1 H, m), 3.66 (3 H, s), 3.44–3.36 (2 H, m) ¹³C-NMR (CDCl₃) 172.38, 166.40, 149.09, 148.23, 141.04, 136.21, 134.47, 133.40, 127.94, 127.71, 127.22, 122.91, 122.31, 119.75, 118.63, 111.40, 109.95, 53.60, 52.49, 27.64 LC/MS-MS 400.08 (M+H⁺).

(S)-Methyl 3-(1*H*-indol-3-yl)-2-[4-(pyrimidin-5-yl)benzamido]propanoate (11). Yield 14 %. mp 101 °C IR 3298, 1736, 1646, 1532, 1415, 1344, 1215 ¹H-NMR (CDCl₃) 9.23 (1 H, s), 8.95 (2 H, s), 8.26 (1 H, s), 7.81 (2 H, d, *J* = 8.20), 7.60–7.55 (3 H, m), 7.36 (1 H, d, *J* = 8.20), 7.21–7.18 (1 H, m), 7.10–7.08 (1 H, m), 7.03–7.02 (1 H, m), 6.76 (1 H, d, *J* = 7.57), 5.20–5.16 (1 H, m), 3.76 (3 H, s), 3.53–3.47 (2 H, m) ¹³C-NMR (CDCl₃) 172.31, 166.11, 157.87, 154.94, 137.37, 136.16, 134.32, 133.38, 128.27, 127.71, 127.12, 127.00, 122.82, 122.41, 119.83, 118.62, 111.38, 109.99, 53.65, 52.55, 27.59 LC/MS-MS 400.98 (M+H⁺).

4-(Thiophen-3-yl)benzoic acid (12). Yield 94 %. mp 280 °C (Lit. 281–282 °C)⁸ ¹H-NMR (d₆-DMSO) 8.05–8.04 (1 H, m), 7.96 (2 H, d, *J* = 8.51), 7.85 (2 H, d, *J* = 8.20), 7.63–7.68 (1 H, m), 7.64–7.63 (1 H, m). ¹³C-NMR (d₆-DMSO) 167.02, 140.31, 139.09, 129.92, 129.07, 127.46, 126.14, 125.99, 122.79.

4-(Pyridin-3-yl)benzoic acid (13). Yield 62 %. mp 215 °C (Lit. 215 °C)⁹ ¹H-NMR (D₂O/TFA) 7.80 (1 H, s), 7.61–7.56 (2 H, m), 7.00 (2 H, d, *J* = 8.51), 6.96–6.93 (1 H, m), 6.56 (2 H, d, *J* = 8.51) ¹³C-NMR was not applied due to the TFA.

4-(Chinolin-3-yl)benzoic acid (14). Yield 92 %. ¹H-NMR (d₆-DMSO/TFA: 1/1) 9.66 (1 H, s), 9.51 (1 H, s), 7.80–7.78 (1 H, m), 8.38 (1 H, d, *J* = 7.88), 8.27 (1 H, d, *J* = 8.51), 8.15–8.08 (5 H, m), 7.98–7.95 (1 H, m) (Lit. 250 MHz, d₆-DMSO: 13.09 (1 H, br s), 9.32 (1 H, d), 8.76 (1 H, d), 8.07 (5 H, m), 7.83 (2 H, m), 7.67 (1 H, m))¹⁰ ¹³C-NMR (d₆-DMSO + TFA) 166.79, 144.39, 132.64, 131.15, 130.18, 127.61, 129.76, 129.47, 118.44, 116.15, 113.85, 111.56.

5-(Pyridin-3-yl)salicylic acid (15). Yield 46 %. mp 260 °C (Lit. 263 °C)¹¹ ¹H-NMR (D₂O/TFA: 1/1) 7.61 (1 H, s), 7.42–7.40 (1 H, m), 7.36–7.35 (1 H, m), 6.93 (1 H, d, *J* = 2.52), 6.78–6.75 (1 H, m), 6.49 (1 H, dd, *J* = 8.51), 5.84 (1 H, d, *J* = 8.83) ¹³C-NMR was not applied due to the TFA.

4-(Pyrimidin-5-yl)benzoic acid (16). Yield 60 %. mp 218 °C (Lit. 220 °C)¹² ¹H-NMR (d₆-DMSO) 9.17 (1 H, s), 9.15 (2 H, s), 8.01 (2 H, d, *J* = 8.20), 7.74 (2 H, d, *J* = 8.20) ¹³C-NMR (d₆-DMSO) 169.60, 157.11, 154.60, 140.35, 133.92, 133.18, 131.47, 131.39, 129.85, 128.75, 125.81.

Acknowledgment

We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) for the grants given to Marcel Holzer and Sigrid Ziegler (KFO129) and the Fonds der Chemischen Industrie for financial support.

References

1. Drazan, K.E., Molecular biology of hepatitis C infection. *Liver Transpl*, 2000. 6, 396-406.
2. Kronenberger, B., C. Sarrazin, W.P. Hofmann, M. von Wagner, E. Herrmann, C. Welsch, R. Elez, B. Ruster, A. Piiper, and S. Zeuzem, Mutations in the putative HCV-E2 CD81 binding regions and correlation with cell surface CD81 expression. *J Viral Hepat*, 2004. 11, 310-8.
3. VanCompernelle, S.E., A.V. Wiznycia, J.R. Rush, M. Dhanasekaran, P.W. Baures, and S.C. Todd, Small molecule inhibition of hepatitis C virus E2 binding to CD81. *Virology*, 2003. 314, 371-80.
4. Holzer, M., S. Ziegler, B. Albrecht, B. Kronenberger, A. Kaul, R. Bartenschlager, L. Kattner, C.D. Klein, and R.W. Hartmann, Identification of terfenadine as an inhibitor of human CD81-receptor HCV-E2 interaction: synthesis and structure optimization. *Molecules*, 2008. 13, 1081-110.
5. Kitadokoro, K., M. Ponassi, G. Galli, R. Petracca, F. Falugi, G. Grandi, and M. Bolognesi, Subunit association and conformational flexibility in the head subdomain of human CD81 large extracellular loop. *Biol Chem*, 2002. 383, 1447-52.

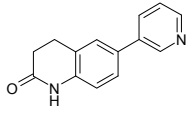
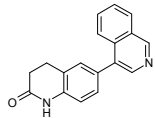
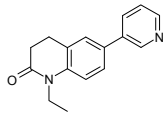
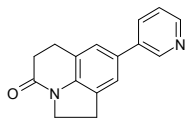
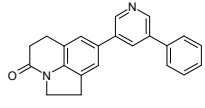
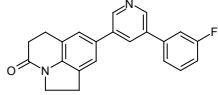
6. Ziegler, S., Kronenberger B., Albrecht B., Kaul A., Gamer A.-L., Klein C. D., Hartmann R. W., Development and Evaluation of a FACS-Based Medium Throughput Assay for HCV Entry Inhibitors. *J. Biomol. Scr.*, 2009. soon to be published
7. Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A.J. Weiner, M. Houghton, D. Rosa, G. Grandi, and S. Abrignani, Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, 1998. 282, 938-41.
8. Francesco, F., M. Gianlorenzo, and T. Aldo, *J Chem Soc B: Phys Org*, 1970. 8, 1595-71.
9. Guiles, R.D., S. Sarma, R.J. DiGate, D. Banville, V.J. Basus, I.D. Kuntz, and L. Waskell, Pseudocontact shifts used in the restraint of the solution structures of electron transfer complexes. *Nat Struct Biol*, 1996. 3, 333-9.
10. Gaster, L. M., (Smithkline Beecham) *GB Patent WO9850358*. 1998.
11. Sarett, L. H., Ruyle, W. C., (Merck & Co, Inc) *DE Patent 1801303*. 1967.
12. Gong, Y., Pauls, H. W., *Synlett*, 2000, 6, 829-31.

4.5. Ergebnisse: Teilprojekt Acetylcholinesterase

Ein neues Therapiekonzept in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen durch Eingreifen in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) besteht in einer Unterbrechung der Aldosteronproduktion. Dies geschieht bevorzugt durch Hemmung des Enzyms CYP11B2, da es sich hierbei um das Hauptenzym der Biosynthese von Aldosteron handelt. Bereits 2001 wurde die Inhibition der CYP11B2 als Target in der Therapie von Hyperaldosteronismus, chronische Herzinsuffizienz und Myokardfibrose postuliert.^{160, 161}

Im Verlauf des letzten Jahrzehnts wurden zahlreiche hochaktive und selektive Hemmstoffe der CYP11B2 synthetisiert. Aufgrund von strukturellen Merkmalen dieser Verbindungen, die ähnlich denen bekannter Acetylcholinesterasehemmstoffe sind,¹⁶² wurden die Verbindungen nicht nur auf Hemmung hepatischer CYP-Enzyme sondern auch auf Hemmung der humanen Acetylcholinesterase untersucht (Tab. 2).

Tabelle 2. Zusammenfassung der Hemmdaten ausgewählter Verbindungen bezüglich CYP11B1, CYP11B2 sowie humaner Acetylcholinesterase

Verbindung	IC ₅₀ [nM]		Selektivitätsfaktor	Hemmung [%] AchE ³		
	V79 11B2 hCYP11B2 ¹	V79 11B hCYP11B1 ²		1 μM	10 μM	100 μM
 SL 125	28	6748	241	2 ± 5	8 ± 7	13 ± 4
 SL 242	0.2	33	165	4 ± 4	0 ± 7	18 ± 5
 SL 250	22	5177	235	6 ± 5	4 ± 3	0 ± 2
 SL 272	1.1	715	650	4 ± 4	5 ± 5	19 ± 6
 SL 449	1.3	58	45	6 ± 4	19 ± 9	unlöslich
 SL 462	1.4	490	350	8 ± 2	15 ± 8	unlöslich

¹ humane CYP11B2 exprimiert in Hamsterfibroblasten; Substrat Desoxycorticosteron (100 nM) ² humane CYP11B1 exprimiert in Hamsterfibroblasten; Substrat Desoxycorticosteron (100 nM) Selektivitätsfaktor: IC₅₀ CYP11B1/ CYP11B2 ³ Hemmung humaner Erythrocyten-Acetylcholinesterase gemäß Ellman et al. 1961¹⁶³

Die in Tabelle 2 zusammengetragenen Hemmdaten für ausgewählte Hemmstoffe von CYP11B2 zeigen, dass keine der getesteten Substanzen selbst im μM -Bereich eine Hemmwirkung bezüglich humaner Erythrozytenacetylcholinesterase aufweisen. Somit können die Verbindungen nach erfolgreichem Abschluss der *in vitro* Untersuchungen unbedenklich auf eine *in vivo* Wirksamkeit untersucht werden.

4.6. Ergebnisse: Teilprojekt 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ I

In den letzten Jahren wurden in unserem Arbeitskreis zahlreiche Verbindungen synthetisiert, die eine Hemmung an dem Enzym 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ I aufweisen. Struktur- und Wirkoptimierungen wurden dabei unter Berücksichtigung der vorliegenden Kristallstrukturen vorgenommen. Die biologische Aktivität sowie die Selektivität der Verbindungen gegenüber dem Enzym 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ II wurden an humanem Enzym überprüft. Aktive und hoch selektive Verbindungen wurden in einem Wechsel aus neuen Synthesen, biologischer Testung und daraus resultierenden Strukturwirkungsbeziehungen kontinuierlich optimiert. Dieser Prozess hat zu Verbindungen geführt, die IC₅₀-Werte im niedrigen nanomolaren Bereich aufweisen. Ebenso zeigen sie hohe Selektivitätsfaktoren gegenüber HSD2 und vernachlässigbar geringe Hemmung der hepatischen CYP-Enzyme sowie der CYP-Enzyme der Steroidbiogenese auf.

Um einen *in vivo* Effekt der Verbindungen zu zeigen, wird ein geeignetes Tiermodell benötigt, um ein entsprechendes Proof of Concept zu erbringen. Als geeignete Krankheitsmodelle hierfür wären Brustkrebsmodelle^{164, 165} aber auch Endometriosemodelle^{166, 167} verschiedener Spezies denkbar.

Ingesamt sind die Aminosäuresequenzen der HSD1 von mehr als 20 Spezies publiziert unter denen auch verschiedene Menschenaffen, Maus und Ratte zu finden sind. Bei der Suche nach einem geeigneten Modell, um die an humanem Enzym wirksamen Substanzen *in vivo* zu testen, wurde zunächst ein Sequenzalignment der verfügbaren Aminosäuresequenzen gemacht. Die Aminosäuren der binding site und der flexiblen Schleife wurden anschließend genauer untersucht und auf Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede in der Sequenz geachtet.

Die Sequenzen der untersuchten Menschenaffen stimmen in binding site und loop vollständig überein (Abb. 18). Somit ist zu erwarten, dass Substanzen die *in vitro* am humanen Enzym aktiv sind auch in einem entsprechenden Krankheitsmodell an Menschenaffen Wirkung zeigen würden. Von Interesse aufgrund des Vorliegens von Tiermodellen sind ebenso die Spezies Maus und Ratte. Ihre Sequenzen sind in der binding site vollkommen identisch, weisen aber Unterschiede in der flexiblen Schleife auf, die sich möglicherweise auf eine Aktivität der Verbindungen auswirken könnten. Bis dato wurden Verbindungen neben dem humanen Enzym auch an aus Rattengewebe isolierter HSD1 getestet. Keine der aktiven Verbindungen wies die Selektivität auf, die sie an humanem Enzym gezeigt hatte. Aus diesem Grund wurde das Erbringen des Proof of Concept am Rattenmodell als ungeeignet eingestuft.

Homo sapiens (Mensch)	Leu 96	Asn 114	Ser 142	Val 143	Leu 149	Tyr 155	Lys 159	Pro 187	Tyr 218	His 221	Ser 222	Val 225	Phe 226	Phe 259	Glu 282
Pan troglodytes (Schimpanse)															
Pongo pygmaeus (Orang-Utan)															
Canis lupus familiaris (Hund)				Met							Ile				Ala
Equus caballus (Pferd)											Cys	Met	Tyr		Glu
Rattus norvegicus (Ratte)				Val				Ala		Gly	Tyr	Ala	Leu		
Mus musculus (Maus)															
Danio rerio (Zebrafisch)				Met				Pro		His	Cys	Val	Phe	Leu	Leu

Homo sapiens (Mensch)	Pro 187	Val 188	His 189	Thr 190	Ala 191	Phe 192	Met 193	Glu 194	Lys 195	Val 196	Leu 197	Gly 198	Pro 199
Pan troglodytes (Schimpanse)													
Pongo pygmaeus (Orang-Utan)													
Canis lupus familiaris (Hund)			Arg				Leu			Leu			
Equus caballus (Pferd)			His				Gln						
Rattus norvegicus (Ratte)	Ala						His						
Mus musculus (Maus)							Tyr				Val		
Danio rerio (Zebrafisch)	Pro	Val	Asn		Asp		Leu	Met	Asn		Glu	Thr	Asp

A.

B.

Abbildung 18: Multiples Alignment der Aminosäuresequenzen der binding site

A. und der flexiblen Schleife B. verschiedener Spezies bei der Suche nach einem geeigneten Tiermodell zum Nachweis des Proof of Concept für Inhibitoren der 17β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ I. C. Angabe der Sequenzidentitäten sowie Homologien der in Abbildung A. und B. angegebenen Spezies im Vergleich zum Menschen (Homo sapiens).

	Identität		Homologie		Identität		Homologie	
	in binding site [%] *		in loop [%] *		in binding site [%] *		in loop [%] *	
Pan troglodytes (chimpanzee)	98.5	98.5	98.5	98.5	98.5	98.5	98.5	98.5
Pongo pygmaeus (Orang-Utan)	94.0	95.0	94.0	95.0	94.0	95.0	94.0	95.0
Canis lupus familiaris (Hund)	79.0	85.0	79.0	85.0	79.0	85.0	79.0	85.0
Equus caballus (Pferd)	75.0	83.0	75.0	83.0	75.0	83.0	75.0	83.0
Rattus norvegicus (Ratte)	70.8	87.0	70.8	87.0	70.8	87.0	70.8	87.0
Mus musculus (Maus)	69.1	77.0	69.1	77.0	69.1	77.0	69.1	77.0
Danio rerio (Zebrafisch)	51.5	71.0	51.5	71.0	51.5	71.0	51.5	71.0

C.

Substratspezifität bedingt durch Leu149

für das Proof of Concept relevante Spezies

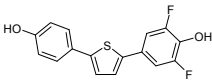
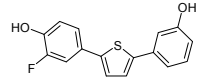
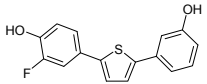
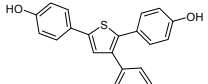
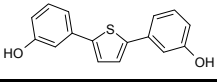
in allen untersuchten Spezies identische Aminosäuren

Katalytische Tetrade: Asn₁₁₄, Ser₁₄₂, Tyr₁₅₅, Lys₁₅₉

Neben den Untersuchungen an Rattenenzym wurde im Rahmen dieser Arbeit Enzym aus der Leber und den Nieren von Hamster sowie Maus isoliert. In allen untersuchten Geweben konnte ein Umsatz von Estron zu Estradiol und umgekehrt nachgewiesen werden. Dabei zeigten die Isolate aus den Nieren bei beiden Spezies einen geringeren Umsatz als die entsprechenden Enzymisolate aus der Leber dieser Spezies auf.

Ausgewählte Verbindungen wurden anschließend an Hamsterenzym auf Aktivität an HSD1 und Selektivität gegenüber HSD2 getestet. Es konnten zwar Verbindungen gefunden werden, die eine Hemmung der HSD1 bei 1 μ M von bis zu 62 % bewirken, allerdings wies keine der untersuchten Verbindungen Selektivität gegenüber HSD2 auf. Eine Erklärung dieser Daten aufgrund der Struktur des Hamsterenzym kann nicht vorgenommen werden, da die Aminosäuresequenz dieses Enzyms nicht publiziert und somit nicht zugänglich ist.

Tabelle 3. Zusammenfassung der Hemmdaten bezüglich 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ I sowie Typ II aus Hamsterleberisolaten.

Verbindung	Hemmung [%] bei 1 μ M					
	Hamster		human		Ratte	
	HSD1 [*]	HSD2 [#]	HSD1 [*]	HSD2 [#]	HSD1 [*]	HSD2 [#]
 EJB238A1	62 \pm 6	88 \pm 2	56 \pm 6	87 \pm 2	81 \pm 4	35 \pm 1
 EJB230A1	46 \pm 6	63 \pm 3	100	52 \pm 1	44 \pm 4	68 \pm 5
 TK14	35 \pm 3	57 \pm 4	100	79 \pm 4	n.d.	n.d.
 CS22	14 \pm 3	57 \pm 2	32 \pm 3	35 \pm 1	29 \pm 4	65 \pm 4
 OAS57	12 \pm 0	11 \pm 4	88 \pm 2	55 \pm 5	16 \pm 3	n.d

Kurzfassung der Isolierung der Enzyme:

* 17 β -HSD1: Isolierung aus Gewebehomogenat nach gradueller Zentrifugation mittels Ammoniumsulfatfällung und Ultrazentrifugation. # 17 β -HSD2: Isolierung aus Gewebehomogenat mittel gradueller Zentrifugation bis zur Ultrazentrifugation. Hamster- und Rattenenzym wurden aus Leberhomogenat isoliert. Humanes Enzym entstammt menschlicher Plazenta.

5. Experimenteller Teil

5.1. Hepatitis C Virus

Die experimentellen Daten in Bezug auf das Thema Hepatitis C sind unter dem Gliederungspunkt 3. der Publikation mit dem Titel „Development and Evaluation of a FACS-Based Medium Throughput Assay for HCV Entry Inhibitors“ zu entnehmen.

5.2. Acetylcholinesterase

Zur Bestimmung der Acetylcholinesteraseaktivität wird der photometrisch auszuwertende Ellmann-Test verwendet. Das Prinzip und die Farbreaktion, die diesem Test zugrunde liegen sind in Abbildung 27 dargestellt. Die Acetylcholinesterase wird dabei mit dem potentiellen Inhibitor vorinkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe des Ellman Reagenzes (DTNB: 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure) sowie des Substrates Acetylthiocholin (ATCh). Das bei der Reaktion entstandene Produkt Thiocholin reagiert mit DTNB zu dem gelben Anion der 5-Thio-2-nitrobenzoesäure, welches bei $\lambda = 412 \text{ nm}$ photometrisch vermessen werden kann.

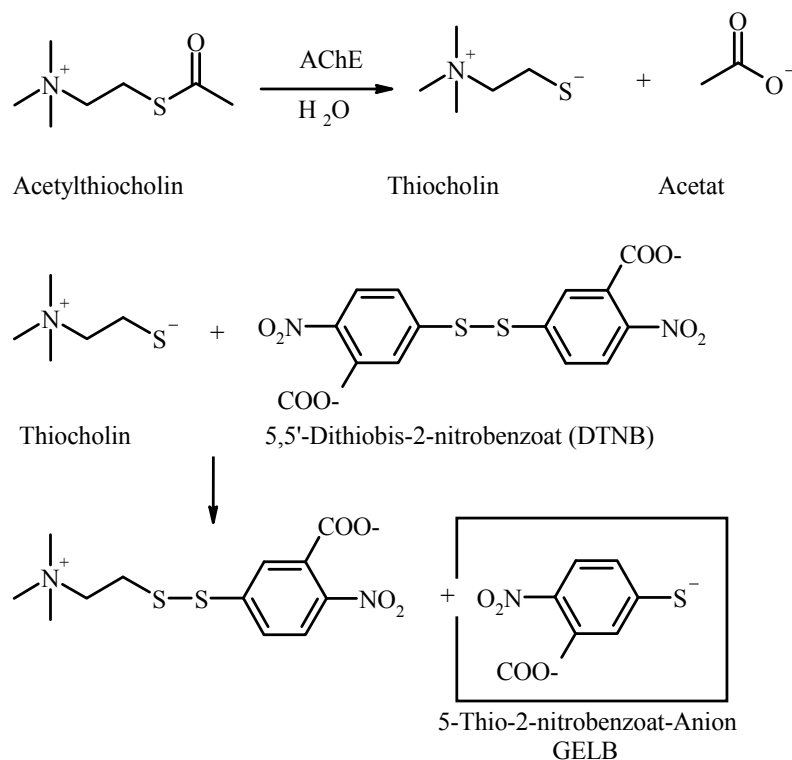


Abbildung 27: Farbreaktion des Ellman Tests zur photometrischen Bestimmung der Hemmung der Acetylcholinesterase ¹⁶³

Material und Methoden: Ellman Test

Phosphatpuffer 0.1 M (pH = 8.0)

13.61 g KH_2PO_4 (Fluka) ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$

Einstellung des pH-Wertes mittels KOH auf $\text{pH} = 8.0 \pm 0.1$. Der Puffer wird steril filtriert und bei Kühlschranktemperatur (4 °C) ca. 7 Tage haltbar.

5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) 0.01 M = Ellman's Reagenz

0,396 g DTNB (Fluka)

0.15 g Na_2CO_3

ad 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$

Das Reagenz kann entweder frisch hergestellt oder in Aliquots zu je 1.5 ml bei -20 °C aufbewahrt werden. Nach dem Auftauen wird das Reagenz unverdünnt eingesetzt.

Acetylthiocholiniodid (ATC) 0.075 M

0.217 g Acetylthiocholiniodid

ad 10 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$

Diese Lösung wird in Aliquots zu je 0.5 ml bei -20 °C aufbewahrt. Nach dem Auftauen wird das Reagenz unverdünnt eingesetzt. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des ATC sollte die Lösung unter Lichtausschluss hergestellt, aufbewahrt und verwendet werden.

Acetylcholinesterase-Lösung

500 Units AChE aus humanen Erythrozyten [E.C. 3.1.1.7] (Sigma-Aldrich)

ad 1 mL steril filtrierte 1 %-igen Gelatine-Lösung

Zur Herstellung einer 5 U/ml Enzymlösung wird diese Lösung mit auf 100 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$ aufgefüllt. Aliquots zu je 0.8 ml sind bei -20 C° über mehrere Monate lagerbar. Auftauen und Wiedereinfrieren des Enzyms ist mit einem deutlichen Aktivitätsverlust verbunden.

Achtung: das Enzym ist gegenüber Detergenzien anfällig.

Das Enzym wird vor dem Test 1:1 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$ verdünnt und somit in einer Konzentration von $c = 2.5 \text{ U/ml}$ im Test eingesetzt.

Inhibitorlösungen

Das Enzym toleriert ohne Aktivitätsverlust eine DMSO-Konzentration von bis zu 3 %. Die Stammlösung sollte somit so gewählt werden, dass diese Konzentration im Test unter der Berücksichtigung der Verdünnung von 1:30 nicht überschritten wird.

Durchführung der Messungen

2840 μ l	Phosphatpuffer 1 mM (pH 8.0)
100 μ l	DMSO / Hemmstofflösung
20 μ l	Acetylcholinesterase (2.5 U/ml)
→	5 min Vorinkubation bei Raumtemperatur
20 μ l	Ellman's Reagenz (0.01 M DTNB)
20 μ l	Acetylthiocholiniodid (0.075 M)
→	gründlich mischen, photometrische Vermessung bei $\lambda = 412$ nm

Gerät und Parametereinstellungen:

Gerät	UV-VIS Spektrophotometer Cary UV 50 (Varian)
Programm	Kinetik
Wellenlänge	$\lambda = 412$ nm
Messzeit	5 min
Messintervall	0.2 min

5.3. 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ I

5.3.1. Isolierung der humanen 17 β -HSD1 aus humaner Plazenta

Während der Schwangerschaft werden 17 β -HSD1 und 2 in großen Mengen in der Plazenta exprimiert. Somit erweist sich dieses Gewebe als geeignet um humanes Enzym daraus zu isolieren. Die Auftrennung der Subtypen 1 und 2 lässt sich aufgrund der subzellulären Lokalisation der Enzyme praktisch gut bewerkstelligen.

Das zytosolische Protein 17 β -HSD1 kann nach entsprechender gradueller Zentrifugation des Gewebehomogenates nach einer Ammoniumsulfat-Fällung mittels Ultrazentrifugation isoliert werden. Der membrangebundene Subtyp 2 hingegen lässt sich durch graduelle Zentrifugation bis zur Ultrazentrifugation aus der Plazentagewebe gewinnen. Die Isolierung der Enzyme aus Maus- bzw. Hamstergewebe wurde nach dem von Sam et al. publizierten Verfahren durchgeführt.¹⁶⁸

5.3.2. Zellfreier Wettbewerbsassay an humaner 17 β -HSD1

Aktivitäts- und Inhibitionstest beruhen auf der Umwandlung von Tritium markiertem Estron (2,4,6,7-³H-Estron in einer Konzentration von 500 nM) in Gegenwart des Kofaktors NADH durch die 17 β -HSD1 zu ³H-Estradiol. Die Steroide werden mittels HPLC (high performance liquid chromatography) aufgetrennt und über einen Radioflowdetektor nachgewiesen. Die

HPLC-Software ermittelt nun den prozentualen Anteil der Steroide im Reaktionsgemisch und ermöglicht somit eine Aussage über die Hemmwirkung der getesteten Verbindungen. Der Test wurde entsprechend den vom Sam et al., 1998 gemachten Vorgaben durchgeführt.¹⁶⁸

5.3.3. Zellfreier Wettbewerbsassay an humaner 17 β -HSD2

Der Assay verläuft analog zu dem Test am Typ 1 Enzym. Hierbei wird allerdings 2,4,6,7-³H-Estradiol (500 nM) in Gegenwart von NAD⁺ als Kofaktor umgesetzt. Auftrennung und Detektion der Steroide erfolgt analog zu der unter 3.2. beschriebenen Methode.

6. Zusammenfassung und Diskussion: Hepatitis C Virus

High throughput Testsysteme sind beliebte und gängige Verfahren, die von hoher Bedeutung für die rasche und kostengünstige Identifizierung aktiver Substanzen verschiedenster Substanzklassen sind. Bis dato wurden etliche Testverfahren publiziert, anhand derer Inhibitoren unterschiedlichster Targets des Hepatitis C Virus nachgewiesen werden können wie beispielsweise Inhibitoren der HCV-Replikation.¹⁶⁹ Allerdings ist hier im Gegensatz zu HIV kein entsprechendes screening-System für Inhibitoren des Viruseintrittes von HCV in die Wirtszelle bekannt.¹⁷⁰

Die Hauptzielsetzung der vorliegenden Arbeit bezogen auf das Thema Hepatitis C Virus bestand aus der Entwicklung und Evaluierung eines FACS-basierten Testsystems im Hochdurchsatzverfahren zur Testung von HCV aktiven Substanzen, die den Eintritt des Virus in die Wirtszelle verhindern sollen. Das Thema wird in der Publikation I im Abschnitt III Ergebnisse und damit in der Veröffentlichung mit dem Titel „Development and Evaluation of a FACS-based medium throughput assay for HCV entry inhibitors“ aufgegriffen.

Für die Etablierung des Testsystems wurde ein zellbasierter Assay mit humanen Leberkarzinomzellen Huh-7.5 als Wirtszelle gewählt. Hierbei handelt es sich um eine speziell nach der CD81-Menge auf der Zelloberfläche selektierten Zelllinie, die im Vergleich zu der Vorläuferzelllinie Huh-7 eine erhöhte Anzahl an CD81-Molekülen auf der Zelloberfläche aufweist. Somit ermöglicht sie bezogen auf Hemmdaten durch die breitere Spanne an vorhandenen Target-Molekülen differenziertere Ergebnisse.

Um die Einfachheit des Testes zu gewährleisten wurde bei der Testentwicklung auf HCVpp bzw. HCVcc verzichtet, da diese unter erhöhten Sicherheitsstufen gemäß Gentechnikgesetz gehandhabt werden müssen. Dies gilt besonders für die infektiösen und pathogenen HCVcc. Neben dem erhöhten Sicherheitsbedarf ist sowohl bei Pseudopartikeln als auch bei viralen Partikeln zu berücksichtigen, dass ihre Herstellung sehr aufwendig ist und lediglich geringe Titer liefert. Folglich ist das Umsetzen eines HCVpp bzw. HCVcc basierten Assays im Hochdurchsatzverfahren zum gegenwärtigen Zeitpunkt kaum denkbar.

Als äquivalenter Ersatz wurde der Antikörper JS81 gewählt, der laut *in vitro* Untersuchungen eine Infektion humaner Zielzellen mit dem Hepatitis C Virus verhindern kann. Somit entspricht das Epitop von JS81 dem viralen E2 Protein und bindet an CD81 in der Art, dass eine weitere Interaktion mit E2 verhindert wird.

Ein potentieller Inhibitor des viralen Eintritts, der ebenfalls an CD81 bindet und somit eine Bindung des Virus verhindert, konkurriert somit mit dem Antikörper JS81 um die

Bindungsstelle auf CD81. Besitzt der Antikörper eine Markierung beispielsweise mit einem Fluoreszenzfarbstoff, so kann mittels FACS-Analyse die Menge an Antikörper bestimmt werden, die nach Behandlung der Zellen mit einem potentiellen Inhibitor je Zelle gebunden vorliegt.

Im Verlauf des Etablierungs- und Evaluierungsprozesses wurden Messparameter und Versuchsbedingungen untersucht und auf Anwendbarkeit im Hochdurchsatzverfahren modifiziert. Zu den untersuchten Parametern gehört die benötigte Antikörpermenge zur Blockierung aller Bindungsstellen auf der Zielzelle, Volumen, Temperatur aber auch die zeitliche Verdrängung des Antikörpers anhand von Hemmstoffen (Abb. 19) ebenso wie eine Reihe von Rahmenbedingungen auf die im Folgenden eingegangen wird.

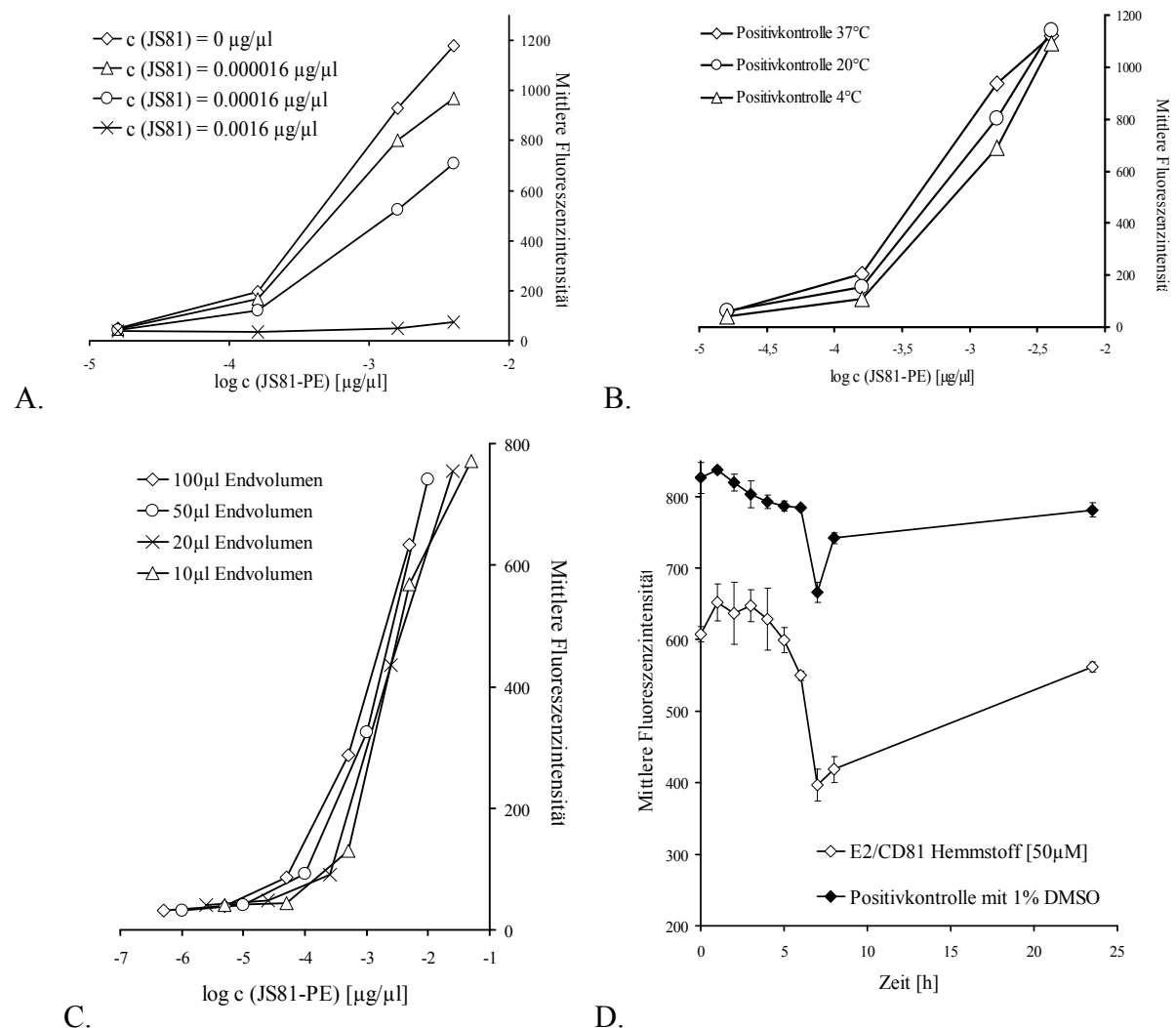


Abbildung 19: A. Konzentrationsabhängige Verdrängung von JS81-PE mittels unmarkiertem Antikörper JS81. B. Abhängigkeit der Antikörperbindung von der Assay-Temperatur. C. Zellgebundene Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von dem Assay-Volumen. D. Zeitliche Abhängigkeit der Verdrängung von JS81-PE von CD81-LEL durch einen Hemmstoff.

Die in Abbildung 18 A. dargestellten Daten zeigen, dass mit steigender Konzentration an unmarkiertem Antikörper steigende Konzentrationen an markiertem Antikörper von der Bindungsstelle verdrängt werden können. Bei $c(\text{JS81}) = 1.6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ sinkt die Fluoreszenzintensität auf Hintergrundniveau. Dies entspricht folglich der Konzentration, bei der alle Bindungsstellen auf CD81 mit unmarkiertem Antikörper besetzt sind. Daher wurde die Testkonzentration von fluoreszenzmarkiertem Antikörper auf $c(\text{JS81-PE}) = 1.6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ festgesetzt. Unter den kommerziell erhältlichen Fluoreszenzlabeln für den anti-human-CD81 Antikörper JS81 hat sich Phycoerythrin (PE) im Gegensatz zu Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) als deutlich stabiler erwiesen. Dies lässt sich mit der pH-Sensitivität des FITC erklären, das dem pH-stabileren und gleichzeitig Signal-stärkeren PE somit in Bezug auf die Anwendung in dem FACS-basierten Screening Assay deutlich unterlegen ist.

Die Assay-Temperatur wurde aufgrund der in Abbildung 19 B. zusammengetragenen Daten auf Raumtemperatur eingestellt. Der Antikörper zeigt eine temperaturabhängige Bindungsstärke des Antikörpers an CD81-LEL. Diese äußert sich in einer geringeren Bindung mit fallender Temperatur. Die Daten zeigen, dass der Test bei Raumtemperatur durchgeführt werden kann und die Notwendigkeit einer Reduktion der Temperatur zu Erhöhung der Bindungsspezifität nicht nötig ist.

Untersuchungen zu dem Assay-Volumen dargestellt in Abb. 19. C. zeigen, dass bei einer gegebenen Konzentration an Antikörper kein Einfluss des Volumens festzustellen ist. Somit wurde das Volumen auf $250 \mu\text{l}$ festgesetzt und entspricht einer Größenordnung in der Tests im 96-well Format einfach durchzuführen sind. Gleiches gilt für die benötigten FACS-Analysen der Proben.

Die zeitliche Reduktion der MFI-Werte (mittlere zellgebundene Fluoreszenzintensität) durch einen potentiellen Hemmstoff ist in Abbildung 19 D. dargestellt. Hier zeigt sich, dass der Hemmstoff im Vergleich zu der mitgeführten Positivkontrolle über den gesamten Messzeitraum von 24 Stunden eine Verschiebung der MFI-Werte zu niedrigeren Werten hin bewirkt. Dabei ist der Betrag um den die Kurve verschoben wird bei allen Messzeitpunkten im Rahmen der Messgenauigkeit gleich. Der Hemmstoff ist somit in den Lage den äußerst affinen und hochsensitiven Antikörper von seiner Bindungsstelle auf der LEL von CD81 zu verdrängen.

Neben diesen grundlegenden Einstellungen der Test-Parameter, die Schwankungen der MFI-Werte in der ersten Messphase aufgedeckt haben, wurden weitere Parameter mit dem Ziel der Eliminierung dieser vorläufigen Schwankungen untersucht. Zu diesen Parametern gehörten die mögliche Bindung des Antikörpers an Oberflächen der Reaktionsgefäße, der Einfluss von

DMSO als Lösungsvermittler, der Einfluss von Trypsin bei dem Ablöseprozess der adhären Huh-7.5 Zelllinie, der Wechsel von Medium zu Phosphatpuffer aber auch Fixierung und Waschschrte nach Inkubation mit dem Antikörper.

Dabei zeigte sich, dass weder die Behandlung der Oberfläche der Reaktionsgefäße mit bovinem Serumalbumin noch die resultierende Menge von 1 % DMSO aus der Verdünnung des Hemmstoffes bei Betrachtung der mittleren, zellgebundenen Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit einen Einfluss auf den tendenziellen Kurvenverlauf haben. Die Vorinkubation der Reaktionsgefäße mit Serumalbumin diente zur Absättigung möglicher Bindungsstellen für den Antikörper. DMSO wurde als Lösungsvermittler eingesetzt. Ähnlich verhält es sich mit der Aufhebung der proteolytischen Wirkung von Trypsin durch Zugabe von Aprotinin.

Dahingegen bewirken Fixierung mit Formaldehyd und auch der Austausch von PBS gegen RPMI als Inkubationsmedium eine Verlagerung der MFI-Werte hin zu niedrigeren Werten wobei der tendenzielle Kurvenverlauf erhalten bleibt. D.h. bei diesen Testmodifikationen wiesen die Positivkontrollen kleinere MFI-Werte und somit auch geringere Mengen an zellgebundenem Antikörper auf. Bei Behandlung der Zellen mit Hemmstoff erwies sich die Reduktion der MFI-Werte hingegen als gleichwertig.

Ebenso wurde der Einfluss von Waschschrten nach Inkubation mit Antikörper und Hemmstoff untersucht. Durch keine der angegebenen Modifikationen konnten die Fluktuationen der MFI-Werte innerhalb der ersten Messstunden reduziert werden. Diese Fluktuationen zeigten sich sowohl bei Positivkontrollen als auch bei Proben, die mit Hemmstoff behandelt wurden. Sie zeichnen sich durch starke Schwankungen der MFI-Werte innerhalb der ersten Stunden nach Beginn der Messung aus.

Die experimentellen Parameter des Testsystems wurden nach diesen eingehenden Untersuchungen entsprechend den Angaben in Publikation I mit dem Titel „Development and Evaluation of a FACS-based medium throughput assay for HCV entry inhibitors“ festgelegt. Der zeitliche Ablauf, Rahmenbedingungen und die einzelnen Versuchsparameter sind im Detail in Abbildung 20 dargestellt.

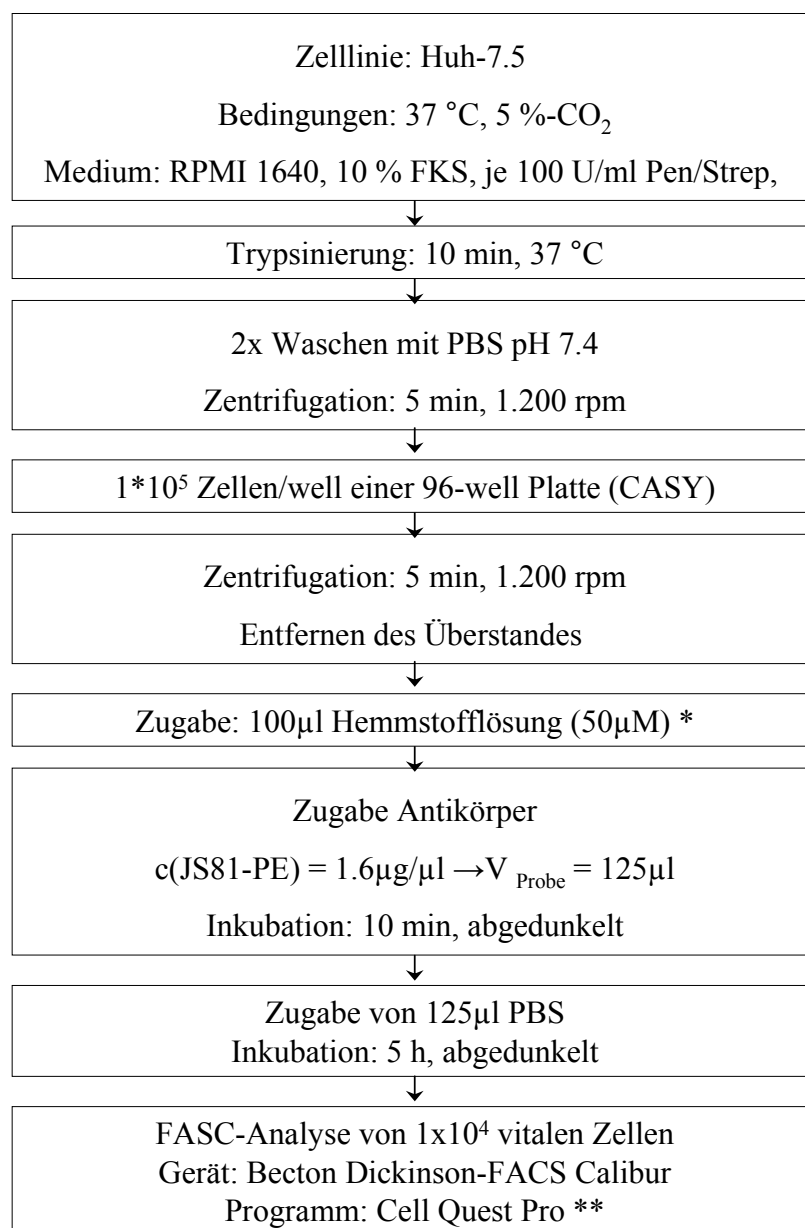


Abbildung 20: Übersicht über den Ablauf des medium throughput Assays zur Bestimmung der Hemmstoff-vermittelten Reduktion der mittleren zellgebundenen Fluoreszenzintensität mittels FACS-Analyse.

Huh-7.5 humane Hepatomzellen mit sehr hohem CD81-Level auf Zelloberfläche

* Hemmstofflösung enthält 1 % DMSO als Lösungsvermittler

** Einstellungen des FACS-Gerätes:

	Spannung	Verstärkungsfaktor	Modus
FSC (forward scatter)	E-1	5.88	linear
SSC (side scatter)	350	1.48	linear
FL2 (585/42 Bandpassfilter)	489	1.00	logarithmisch

Für den Test wurde ein Z-Faktor von 0.82 errechnet. Dieser berechnet sich wie folgt:

$$Z = \frac{\mu_p - \mu_n}{\sigma_p + \sigma_n}$$

$\mu_{p/n}$	Mittelwert Positiv- / Negativkontrolle
$\sigma_{p/n}$	Standardabweichung Positiv- / Negativkontrolle

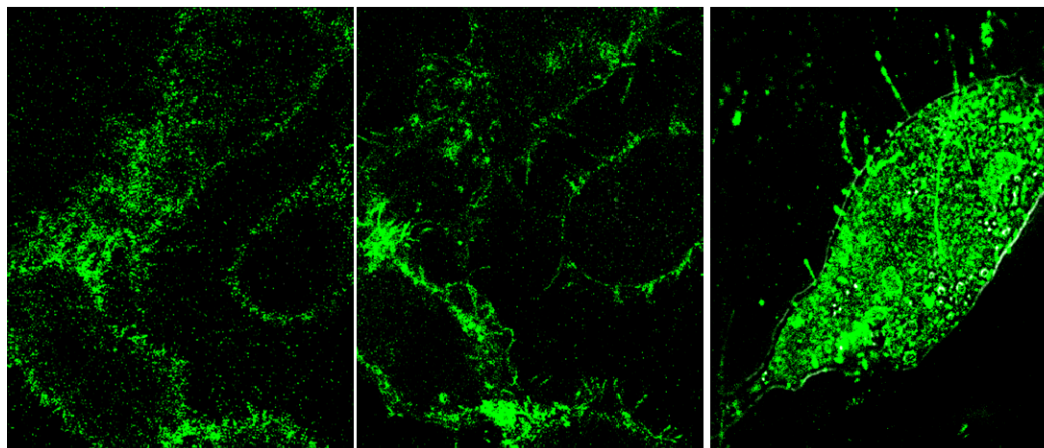
Für die Beurteilung des Z-Faktors gilt:

Z-Faktor	Bewertung
1.0	Idealwert; große dynamische Bandbreite, niedrige Standardabweichung
$0.5 \leq Z \leq 1.0$	Test hervorragend geeignet für Hochdurchsatzassays
$0 < Z < 0.5$	Test unbrauchbar für Hochdurchsatzassays
$Z \leq 0$	Negativ- und Positivkontrollen überlappen; Test für Screenings ungeeignet

Dieser ausgezeichnete Z-Faktor, konnte durch keine der angeführten Veränderungen weiter verbessert werden, lag aber in allen untersuchten Fällen über einem Wert von 0.6. Der hohe Z-Faktor und auch die geringen Standardabweichungen des Tests unter 6 % der Messungen zeigen, dass es sich hierbei um einen zuverlässigen Test handelt anhand dessen Substanzen im Hochdurchsatzverfahren untersucht werden können.

Um auszuschließen, dass die Reduktion der zelloberflächengebundenen Fluoreszenz nicht durch die eingesetzten Hemmstoffe bewirkt wird, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Anhand dieser Analysen wurde die Zellmembran-gebundene CD81-Menge, CD81 im Überstand sowie CD81 im Zellysate von behandelten im Vergleich zu unbehandelten Zellen, anhand eines Chemilumineszenz-basierten Verfahrens bestimmt. Es konnte nicht gezeigt werden, dass die getesteten Substanzen einen Einfluss auf die Lokalisation von CD81 haben, da weder im Überstand CD81 nachgewiesen werden konnte, noch in Membranfraktion und Zytosol unterschiedliche Verteilungen von CD81 im Vergleich zu unbehandelten Zellen nachweisbar waren.

Der Einfluss der Substanzen auf Huh-7.5 Zellen wurde ebenfalls mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Substanzen insofern einen Einfluss auf die Zellen zu haben scheinen, als dass sie eine Akkumulation der im Vergleich zu unbehandelten Proben diffus über die Zelle verteilten CD81-Moleküle bewirken. Ebenso bilden die Zellen sogenannte Filopodien aus, auf denen CD81 in vermehrtem Maß vorzukommen scheint (Abb. 21). Dies hat keinen Einfluss auf die mittels FACS-Analysen ermittelten Hemmdaten, da hier die Gesamtfluoreszenz je Zelle gemessen wird, unabhängig von deren Verteilung auf der Zelloberfläche. Die Potenz der ermittelten Hemmstoffe konnte in weiteren Untersuchungen, auf die später eingegangen wird, bestätigt werden.



adhärente Huh-7.5 Zellen

Positivkontrolle: Inkubation mit PBS / 1 % DMSO	Probe: 10 min Inkubation mit MH210 bei 50 μ M	Probe: 30 min Inkubation mit MH210 bei 50 μ M
---	---	---

Abbildung 21: Konfokale Laserskanning Mikroskopie von Huh-7.5- Zellen im Verlauf der Behandlung mit dem HCV-aktiven Terfenadinderivat MH210 (N-(6-(4-*tert*-Butylphenyl)-hexan-6-on)-azacyclonol) in einer Konzentration von 50 μ M.

Neben der Etablierung und Validierung dieses Testsystems bestand die Zielsetzung der Arbeit in der Suche einer Hitverbindung anhand derer eine Leitstruktur abgeleitet werden sollte. Diese sollte dann durch rationales Design modifiziert und in ihrer Wirksamkeit optimiert werden.

In einem virtuellen screening, das die konformationellen Unterschiede der großen extrazellulären Schleife von CD81 berücksichtigt^{104, 105} und anhand dessen mehr als 400.000 Verbindungen aus der Maybridge Datenbank, den Datenbanken ACD (Available Chemical Directory) sowie NCI (National Cancer Institute) und der Arbeitskreisinternen Datenbank durchsucht wurden, wurden 200 Treffer ermittelt. Diese können mit dem Cleft der LEL in der Art wechselwirken, dass eine weitere Interaktion mit dem viralen E2 Protein unterbunden werden kann. Untersuchungen der biologischen Wirksamkeit dieser virtuellen Treffer brachten Benzylsalicylat als Kandidaten mit Potential zur Optimierung hervor. Benzylsalicylat zeigte bei einer Konzentration von 50 μ M eine Reduktion des durchflusszytometrisch ermittelten MFI-Wertes um 25 % auf.

Im Rahmen der Wirkoptimierung wurden insgesamt 37 von dieser Grundstruktur abgeleitete Verbindungen synthetisiert (Abb. 22) und getestet (detaillierte Strukturformeln, Synthesevorschriften und Hemmdaten können in Abschnitt III der Publikation II mit dem Titel „Structural modifications of salicylates: Inhibitors of human CD81-receptor HCV-E2 interaction“ entnommen werden).

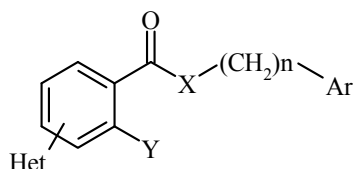


Abbildung 22: Allgemeine Struktur der Benzylsalicylat-Derivate (Het: Heterozyklus; X: -O, -NH; Y: -H, -OH ; Ar : Aromat; n: 0, 1)

Keine der synthetisierten Verbindungen zeigte eine signifikante Steigerung der Aktivität im Vergleich zu Benzylsalicylat. Die wider Erwarten ausgebliebene Steigerung der Aktivität durch die eingeführten Modifikationen lässt sich möglicherweise durch ein ungünstig gewähltes Substitutionsmuster erklären. Folglich wurden erneut Dockingstudien durchgeführt, um eine Aussage darüber treffen zu können, welche räumliche Ausdehnung die von der C- und D-Helix der LEL gebildete Furche für ein inhibitorisches Molekül zulässt. Diese Dockingstudien mit Benzylsalicylat haben gezeigt, dass diese Furche durchaus größere Verbindungen als Benzylsalicylat tolerieren würde (Abb. 23).

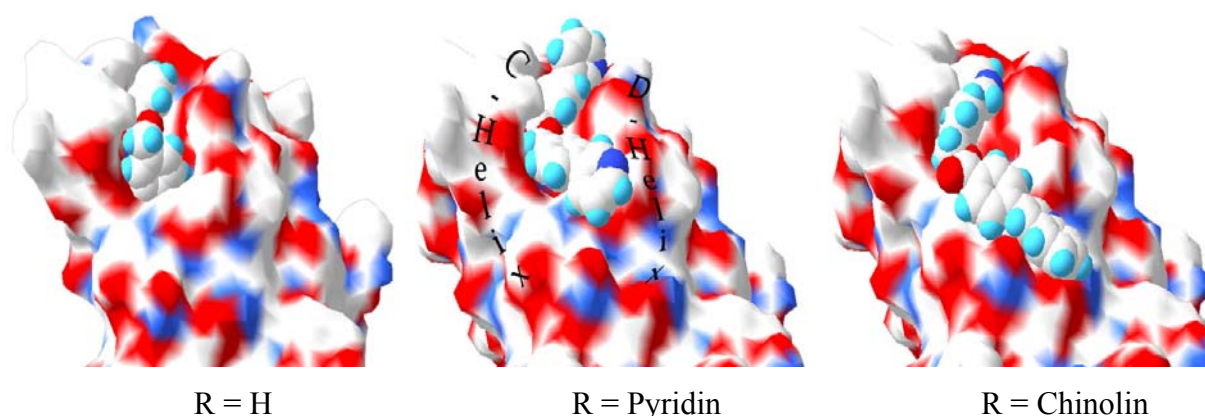


Abbildung 23: Docking von Benzylsalicylat-Derivaten mit unterschiedlichen Substituenten (R) am Benzylrest zur Optimierung der Leitverbindung Benzylsalicylat durch Einführung größerer Substituenten am Benzylrest.

So würde eine Erweiterung des Benzylringes um einen Pyridinrest laut Dockingstudien durchaus toleriert werden. Dahingegen erweist sich ein Chinolinrest als zu sperrig und ragt laut Dockingstudien aus dem Cleft heraus. Um detaillierte Strukturwirkungsbeziehungen ableiten zu können, wurden Mikrowellen-gestützt mehrere Verbindungen mit dem Ziel synthetisiert das planare, aromatische Ringsystem zu erweitern. (Abb. 24). Diese Modifikationen sollten zusätzlich spezifische Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen mit dem LEL ermöglichen.

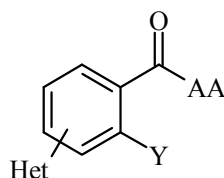


Abbildung 24: Allgemeine Struktur von Benzylsalicylat abgeleiteten Benzoessäureamide (Het: Heterozyklus; Y: -H, -OH; AA: L-Alanin-Ethylester, L-Phenylalanin-Ethylester, L-Tryptophan-Methylester).

Keine der synthetisierten Verbindungen und somit auch keine der vorgenommenen Strukturoptimierungen resultierte in einer Steigerung der biologischen Aktivität im Vergleich zu Benzylsalicylat.

Im Rahmen eines daraufhin durchgeführten biologischen Screenings von 470 strukturell diversen Verbindungen wurde Terfenadin als weitere Substanz mit biologischer Aktivität nämlich mit 26 % Reduktion des MFI-Wertes bei 50 μ M gefunden (Abb. 24 A.). Unter den untersuchten Verbindungen waren 290 Verbindungen aus der institutsinternen Substanz-Bibliothek und 180 Naturstoffe.

Zu Wirkoptimierung wurde diese Verbindung verschiedenen Strukturmodifikationen unterzogen, wobei die Länge des Alkyllinkers zwischen dem Piperidin und dem Phenylrest mit einer Länge von drei und fünf CH_2 -Gruppen gewählt wurde. Der Alkylsubstituent am Phenylring wurde als Methyl- bis Butylrest gewählt. Die sekundäre OH-Gruppe wurde zu dem entsprechenden Keton oxidiert und der Azazyklonolrest wurde entsprechend den Angaben in Abbildung 25 B. variiert.

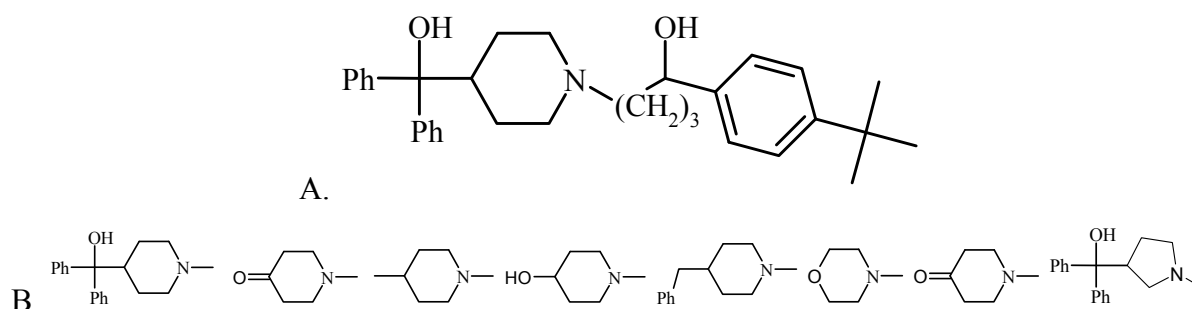


Abbildung 25: A. Strukturformel von Terfenadin. B. Modifikationen am Azazyklonolrest von Terfenadin.

Insgesamt wurden 80 Terfenadinderivate synthetisiert. Die Wirksamkeit gegenüber Terfenadin konnte durch Verlängerung des Linkers auf $n=5$ und einem iso-Butyl-Rest am Phenylrest von Terfenadin bei 50 μ M mit 26 % Reduktion des MFI-Wertes auf über 70 % Reduktion des MFI-Wertes gesteigert werden (Abb. 26).

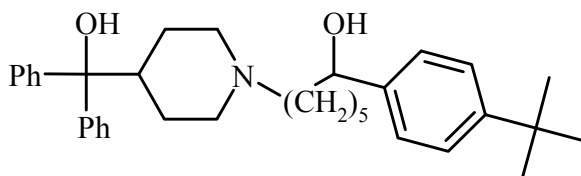


Abbildung 26: Aktivstes Terfenadinderivat mit 71 % Reduktion der zellgebundenen Fluoreszenzintensität bei 50 μM .

Die biologischen Daten zeigen, dass räumlich anspruchsvolle Substituenten am Phenylrest ebenso wie ein großer Substituent an der para-Position des Moleküls und auch die OH-Gruppe für die Aktivität notwendig sind. Letztere kann durch Wasserstoffbrücken-akzeptoren wie beispielsweise Ketone, Ester oder Amide ersetzt werden. Eine Steigerung der Aktivität ist ebenfalls bei Einführung längerer Alkyl linker festzustellen.

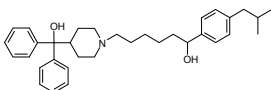
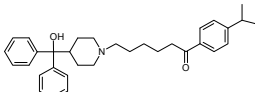
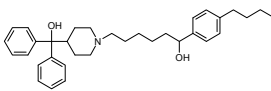
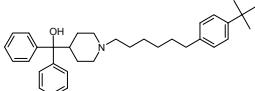
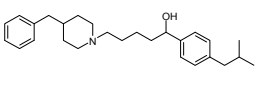
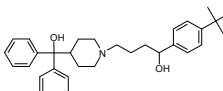
Zur weiteren Bestätigung der Aussagekraft des nun etablierten Testsystems wurden ausgewählte Substanzen anhand eines Infektionsmodells mit HCVcc getestet und die Menge an intrazellulärer viraler RNA als Maß für die Anzahl an infizierten Zellen bestimmt.

Von insgesamt mehreren Hundert Substanzen, die am FACS-basierten Assay getestet wurden, weisen 50 eine signifikante Hemmung größer zehn Prozent auf. Davon bewirken 23 Substanzen eine Reduktion der zellgebundenen Fluoreszenz um mehr als 30 %. Die aktivste Verbindung MH212 vermindert die Fluoreszenzintensität um 71 %.

Insgesamt wurden fast 70 Verbindungen unterschiedlichster Strukturklassen und mit unterschiedlich starker Hemmwirkung bezüglich unseres Medium-throughput Assays auf ihre Fähigkeit HCVcc an einer Infektion von Huh-7.5 Zellen zu hindern. 15 der 17 am Medium-throughput aktiven Substanzen konnte eine Infektion partiell hemmen. Lediglich zwei Substanzen Cannabigerol und Clotrimazol wiesen keine inhibitorische Potenz auf. Dies lässt sich dadurch erklären, dass diese Substanzen in dem Infektionsassay bei 5 μM getestet wurden und nicht wie in dem FACS-basierten Assay bei 50 μM . Der Konzentrationsunterschied ist bedingt durch zytotoxische Effekte, die bei 50 μM im Infektionsassay auftraten. Einige im FACS-Assay als inaktiv bewerteten Substanzen wiesen im Infektionsassay eine schwache Aktivität auf. Diese kann dadurch begründet werden, dass im Infektionsassay lediglich der Umsatz an Luziferin im Zelllysat nach Infektion und 72 stündiger Kultivierung der Zellen gemessen wird. Die viralen Partikel enthalten ein Reportergen für Luziferin, das bei einer Infektion in die Zielzelle gelangt und dort repliziert wird. Prozesse, die den Zellzyklus beeinflussen oder einen negativen Einfluss auf die Proteinbiosynthese haben, resultieren somit ebenfalls in einer Reduktion der Luziferaseaktivität.

Alle Terfenadinderivate die im Verdrängungsassay eine deutliche Reduktion der zellgebundenen JS81-PE aufwiesen, konnten in einem Infektionsassay den Eintritt viraler HCV-Partikel ebenfalls deutlich reduzieren. Dies zeigt sich in dem verminderten Umsatz an Luziferin, bedingt durch geringere Konzentrationen an Luciferase in den zu infizierenden Zellen. Alle Hemmstoffe wiesen bei entsprechender Untersuchung ebenso eine deutliche Reduktion der intrazellulären HCV-RNA Menge auf (Tab. 2).

Tabelle 3. Zusammenfassung der Hemmdaten verschiedener Terfenadinderivate

Struktur	Reduktion		
	MFI ^a	Luziferaseaktivität [μM] ^b	HCV RNA [%] ^c
 MH212	71	32 [0.5 μM]	n. d.
 MH182	63	43 [0.5 μM]	n. d.
 MH191	49	40 [0.5 μM]	n. d.
 BA40	33	40 [0.5 μM]	29 [0.5 μM]
 SR9	30	61 [5 μM]	45 [5 μM]
 Terfenadine	26	30 [0.5 μM]	19 [0.5 μM]

a. Reduktion der mittleren Fluoreszenzintensität bei 50 μM . SD*: $\leq 6\%$ **b.** Reduktion der Luziferaseaktivität nach Infektion mit HCV-viralen Partikeln mit Luziferase als Reportergen. Testkonzentration siehe Tabelle. SD: $\leq 8\%$. **c.** Reduktion der intrazellulären HCV-RNA nach Infektion mit HCVcc bestimmt mittels RT-PCR. SD: $\leq 10\%$. * SD: Standardabweichung

Die Daten aus dem Infektionsmodell und der Quantifizierung der intrazellulären viralen RNA nach Infektion zeigen, dass es eine deutliche Korrelation zwischen dem hier vorgestellten Testsystem und dem Infektionsassay mit viralen HCV-Partikeln gibt.

Die Vorteile des FACS-basierten Assays gegenüber dem Infektionsassay sowie quantitativer RT-PCR zur Bestimmung der intrazellulären HCV-RNA nach Infektion mit HCVcc werden im Folgenden diskutiert. Der Infektionsassay ist zwar wesentlich sensitiver, was sich darin

widerspiegelt, dass die Hemmstoffe selbst bei einer um zwei Zehnerpotenzen niedrigeren Konzentration hier immer noch einen Effekt aufweisen. Dieser ist im FACS-basierten Test nicht mehr nachweisbar ist. Allerdings werden anhand des Infektionsassays verschiedenste Faktoren gemessen, die einen Einfluss auf die Expression der viral kodierten Luziferase haben. Außerdem muss der Test aufgrund der infektiösen viralen Partikel unter S3-Bedingungen durchgeführt werden.

Das FACS-basierte Testsystem kann dazu genutzt werden verfügbare Substanzdatenbanken nach Treffern zu durchsuchen. Diese können anschließend Strukturmodifikationen unterzogen werden, die zu einer Steigerung der Aktivität führen können.

Das FACS-basierte Testsystem bietet das Potential riesige Datenbanken zu testen, da die Möglichkeit besteht Substanzen bereits im 96-well-Format käuflich zu erwerben. Die Platten können bei entsprechender Ausrüstung des FACS-Gerätes mit einem Platten-Lesegerät vollautomatisch vermessen und ausgewertet werden. Somit ist es denkbar in kurzer Zeit eine Vielfalt an Strukturklassen nach möglichen Hemmstoffen zu durchsuchen und mit den gefundenen Treffern erneut Dockingstudien durchzuführen und Strukturoptimierungen vorzunehmen. Schließlich erhält man auf diese Weise einen hochpotenten Hemmstoff, der selektiv Hepatitis C Virus am Eintritt in die Wirtszelle hindert.

Der von uns etablierte und evaluierte Test im Hochdurchsatzverfahren zur FACS-basierten Suche nach Inhibitoren der CD81-LEL – HCV-E2 Interaktion erweist sich als zuverlässig, schnell und kostengünstig. Die gefundenen Treffer eignen sich, wie am Beispiel von Terfenadin bewiesen, hervorragend zur weiteren Wirkoptimierung und sind vielversprechende Kandidaten für eine weitere Verbesserung der inhibitorischen Potenz gegenüber HCV.

7. Referenzen

1. Norrby, E., Nobel Prizes and the emerging virus concept. *Arch Virol*, 2008. 153, 1109-23.
2. Barker, L.F. and R.J. Gerety, The clinical problem of hepatitis transmission. *Prog Clin Biol Res*, 1976. 11, 163-82.
3. Feinstone, S.M., A.Z. Kapikian, R.H. Purcell, H.J. Alter, and P.V. Holland, Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med*, 1975. 292, 767-70.
4. Rosa, D., S. Campagnoli, C. Moretto, E. Guenzi, L. Cousens, M. Chin, C. Dong, A.J. Weiner, J.Y. Lau, Q.L. Choo, D. Chien, P. Pileri, M. Houghton, and S. Abrignani, A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93, 1759-63.
5. Higginbottom, A., E.R. Quinn, C.C. Kuo, M. Flint, L.H. Wilson, E. Bianchi, A. Nicosia, P.N. Monk, J.A. McKeating, and S. Levy, Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J Virol*, 2000. 74, 3642-9.
6. Choo, Q.L., K.H. Richman, J.H. Han, K. Berger, C. Lee, C. Dong, C. Gallegos, D. Coit, R. Medina-Selby, P.J. Barr, and et al., Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88, 2451-5.
7. Martell, M., J.I. Esteban, J. Quer, J. Genesca, A. Weiner, R. Esteban, J. Guardia, and J. Gomez, Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol*, 1992. 66, 3225-9.
8. Davidson, F., P. Simmonds, J.C. Ferguson, L.M. Jarvis, B.C. Dow, E.A. Follett, C.R. Seed, T. Krusius, C. Lin, G.A. Medgyesi, and et al., Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. *J Gen Virol*, 1995. 76, 1197-204.
9. Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H.G. Krausslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager, and T.J. Liang, Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*, 2005. 11, 791-6.
10. Andre, P., G. Perlemuter, A. Budkowska, C. Brechot, and V. Lotteau, Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. *Semin Liver Dis*, 2005. 25, 93-104.
11. Pozzetto, B., T. Bourlet, F. Grattard, and L. Bonneval, Structure, genomic organization, replication and variability of hepatitis C virus. *Nephrol Dial Transplant*, 1996. 11, 2-5.
12. Plagemann, P.G., Hepatitis C virus. *Arch Virol*, 1991. 120, 165-80.

13. Honda, M., L.H. Ping, R.C. Rijnbrand, E. Amphlett, B. Clarke, D. Rowlands, and S.M. Lemon, Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology*, 1996. 222, 31-42.
14. Friebe, P. and R. Bartenschlager, Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol*, 2002. 76, 5326-38.
15. De Francesco, R., Molecular virology of the hepatitis C virus. *J Hepatol*, 1999. 31, 47-53.
16. Walker C, M., Hepatitis C virus. *Persistent Viral Infections*. Chichester, Wiley, 1999, 93-115.
17. Moradpour, D., F. Penin, and C.M. Rice, Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol*, 2007. 5, 453-63.
18. Bukh, J., R.H. Purcell, and R.H. Miller, Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91, 8239-43.
19. McLauchlan, J., Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat*, 2000. 7, 2-14.
20. Ray, R.B. and R. Ray, Hepatitis C virus core protein: intriguing properties and functional relevance. *FEMS Microbiol Lett*, 2001. 202, 149-56.
21. Tellinghuisen, T.L. and C.M. Rice, Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Curr Opin Microbiol*, 2002. 5, 419-27.
22. Zhao, W.D., E. Wimmer, and F.C. Lahser, Poliovirus/Hepatitis C virus (internal ribosomal entry site-core) chimeric viruses: improved growth properties through modification of a proteolytic cleavage site and requirement for core RNA sequences but not for core-related polypeptides. *J Virol*, 1999. 73, 1546-54.
23. Kountouras, J., C. Zavos, and D. Chatzopoulos, Apoptosis in hepatitis C. *J Viral Hepat*, 2003. 10, 335-42.
24. Schulze zur Wiesch, J., H. Schmitz, E. Borowski, and P. Borowski, The proteins of the Hepatitis C virus: their features and interactions with intracellular protein phosphorylation. *Arch Virol*, 2003. 148, 1247-67.
25. Moorman, J.P., M. Joo, and Y.S. Hahn, Evasion of host immune surveillance by hepatitis C virus: potential roles in viral persistence. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2001. 49, 189-94.
26. Deleersnyder, V., A. Pillez, C. Wychowski, K. Blight, J. Xu, Y.S. Hahn, C.M. Rice, and J. Dubuisson, Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J Virol*, 1997. 71, 697-704.
27. Goffard, A., N. Callens, B. Bartosch, C. Wychowski, F.L. Cosset, C. Montpellier, and J. Dubuisson, Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol*, 2005. 79, 8400-9.

28. Bartosch, B. and F.L. Cosset, Cell entry of hepatitis C virus. *Virology*, 2006. 348, 1-12.
29. Cocquerel, L., C. Voisset, and J. Dubuisson, Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol*, 2006. 87, 1075-84.
30. Mizushima, H., M. Hijikata, S. Asabe, M. Hirota, K. Kimura, and K. Shimotohno, Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini. *J Virol*, 1994. 68, 6215-22.
31. Griffin, S.D., R. Harvey, D.S. Clarke, W.S. Barclay, M. Harris, and D.J. Rowlands, A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *J Gen Virol*, 2004. 85, 451-61.
32. Griffin, S.D., L.P. Beales, D.S. Clarke, O. Worsfold, S.D. Evans, J. Jaeger, M.P. Harris, and D.J. Rowlands, The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett*, 2003. 535, 34-8.
33. Pavlovic, D., D.C. Neville, O. Argaud, B. Blumberg, R.A. Dwek, W.B. Fischer, and N. Zitzmann, The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100, 6104-8.
34. Sakai, A., M.S. Claire, K. Faulk, S. Govindarajan, S.U. Emerson, R.H. Purcell, and J. Bukh, The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100; 11646-51.
35. Lohmann, V., F. Korner, J. Koch, U. Herian, L. Theilmann, and R. Bartenschlager, Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, 1999. 285; 110-3.
36. Blight, K.J., A.A. Kolykhalov, and C.M. Rice, Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science*, 2000. 290, 1972-4.
37. Lindenbach, B.D., *Flaviviridae: The Virus and their replication*. Fields Virology, ed. D.M.H.P.M. Knipe. Vol. 4th ed. 2001, Philadelphia. 991-1042.
38. Pallaoro, M., A. Lahm, G. Biasiol, M. Brunetti, C. Nardella, L. Orsatti, F. Bonelli, S. Orru, F. Narjes, and C. Steinkuhler, Characterization of the hepatitis C virus NS2/3 processing reaction by using a purified precursor protein. *J Virol*, 2001. 75, 9939-46.
39. Lindenbach, B.D., M.J. Evans, A.J. Syder, B. Wolk, T.L. Tellinghuisen, C.C. Liu, T. Maruyama, R.O. Hynes, D.R. Burton, J.A. McKeating, and C.M. Rice, Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*, 2005. 309, 623-6.
40. Kalinina, O., H. Norder, S. Mukomolov, and L.O. Magnius, A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *J Virol*, 2002. 76, 4034-43.
41. Pietschmann, T., A. Kaul, G. Koutsoudakis, A. Shavinskaya, S. Kallis, E. Steinmann, K. Abid, F. Negro, M. Dreux, F.L. Cosset, and R. Bartenschlager, Construction and

- characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103, 7408-13.
42. Dumoulin, F.L., A. von dem Bussche, J. Li, L. Khamzina, J.R. Wands, T. Sauerbruch, and U. Spengler, Hepatitis C virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and viral promoters in hepatic and nonhepatic cell lines. *Virology*, 2003. 305, 260-6.
43. Lindenbach, B.D. and C.M. Rice, Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature*, 2005. 436, 933-8.
44. Tai, C.L., W.K. Chi, D.S. Chen, and L.H. Hwang, The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J Virol*, 1996. 70, 8477-84.
45. Deng, L., M. Nagano-Fujii, M. Tanaka, Y. Nomura-Takigawa, M. Ikeda, N. Kato, K. Sada, and H. Hotta, NS3 protein of Hepatitis C virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner. *J Gen Virol*, 2006. 87, 1703-13.
46. Failla, C., L. Tomei, and R. De Francesco, Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol*, 1994. 68, 3753-60.
47. Kim, J.L., K.A. Morgenstern, C. Lin, T. Fox, M.D. Dwyer, J.A. Landro, S.P. Chambers, W. Markland, C.A. Lepre, E.T. O'Malley, S.L. Harbeson, C.M. Rice, M.A. Murcko, P.R. Caron, and J.A. Thomson, Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell*, 1996. 87, 343-55.
48. Foy, E., K. Li, C. Wang, R. Sumpter, Jr., M. Ikeda, S.M. Lemon, and M. Gale, Jr., Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science*, 2003. 300, 1145-8.
49. Hugle, T., F. Fehrmann, E. Bieck, M. Kohara, H.G. Krausslich, C.M. Rice, H.E. Blum, and D. Moradpour, The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology*, 2001. 284, 70-81.
50. Yu, G.Y., K.J. Lee, L. Gao, and M.M. Lai, Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *J Virol*, 2006. 80, 6013-23.
51. Egger, D., B. Wolk, R. Gosert, L. Bianchi, H.E. Blum, D. Moradpour, and K. Bienz, Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol*, 2002. 76, 5974-84.
52. Einav, S., M. Elazar, T. Danieli, and J.S. Glenn, A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *J Virol*, 2004. 78, 11288-95.
53. Brass, V., E. Bieck, R. Montserret, B. Wolk, J.A. Hellings, H.E. Blum, F. Penin, and D. Moradpour, An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem*, 2002. 277, 8130-9.

-
54. Penin, F., V. Brass, N. Appel, S. Ramboarina, R. Montserret, D. Ficheux, H.E. Blum, R. Bartenschlager, and D. Moradpour, Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem*, 2004. 279, 40835-43.
 55. Appel, N., T. Schaller, F. Penin, and R. Bartenschlager, From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication. *J Biol Chem*, 2006. 281, 9833-6.
 56. Seeger, C., Salient molecular features of hepatitis C virus revealed. *Trends Microbiol*, 2005. 13, 528-34.
 57. Tan, S.L. and M.G. Katze, How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology*, 2001. 284, 1-12.
 58. Reyes, G.R., The nonstructural NS5A protein of hepatitis C virus: an expanding, multifunctional role in enhancing hepatitis C virus pathogenesis. *J Biomed Sci*, 2002. 9, 187-97.
 59. Macdonald, A. and M. Harris, Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. *J Gen Virol*, 2004. 85, 2485-502.
 60. Ivashkina, N., B. Wolk, V. Lohmann, R. Bartenschlager, H.E. Blum, F. Penin, and D. Moradpour, The hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase membrane insertion sequence is a transmembrane segment. *J Virol*, 2002. 76, 13088-93.
 61. Bartenschlager, R., M. Frese, and T. Pietschmann, Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res*, 2004. 63, 71-180.
 62. Choi, S.H., K.J. Park, B.Y. Ahn, G. Jung, M.M. Lai, and S.B. Hwang, Hepatitis C virus nonstructural 5B protein regulates tumor necrosis factor alpha signaling through effects on cellular I κ B kinase. *Mol Cell Biol*, 2006. 26, 3048-59.
 63. Shimakami, T., M. Honda, T. Kusakawa, T. Murata, K. Shimotohno, S. Kaneko, and S. Murakami, Effect of hepatitis C virus (HCV) NS5B-nucleolin interaction on HCV replication with HCV subgenomic replicon. *J Virol*, 2006. 80(7): p. 3332-40.
 64. Munakata, T., M. Nakamura, Y. Liang, K. Li, and S.M. Lemon, Down-regulation of the retinoblastoma tumor suppressor by the hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102, 18159-64.
 65. Barth, H., C. Schafer, M.I. Adah, F. Zhang, R.J. Linhardt, H. Toyoda, A. Kinoshita-Toyoda, T. Toida, T.H. Van Kuppevelt, E. Depla, F. Von Weizsacker, H.E. Blum, and T.F. Baumert, Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem*, 2003. 278, 41003-12.
 66. Koutsoudakis, G., A. Kaul, E. Steinmann, S. Kallis, V. Lohmann, T. Pietschmann, and R. Bartenschlager, Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol*, 2006. 80, 5308-20.

67. Agnello, V., G. Abel, M. Elfahal, G.B. Knight, and Q.X. Zhang, Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96, 12766-71.
68. Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A.J. Weiner, M. Houghton, D. Rosa, G. Grandi, and S. Abrignani, Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, 1998. 282, 938-41.
69. Kapadia, S.B., H. Barth, T. Baumert, J.A. McKeating, and F.V. Chisari, Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I. *J Virol*, 2007. 81, 374-83.
70. Voisset, C., M. Lavie, F. Helle, A. Op De Beeck, A. Bilheu, J. Bertrand-Michel, F. Terce, L. Cocquerel, C. Wychowski, N. Vu-Dac, and J. Dubuisson, Ceramide enrichment of the plasma membrane induces CD81 internalization and inhibits hepatitis C virus entry. *Cell Microbiol*, 2008. 10, 606-17.
71. Scarselli, E., H. Ansuini, R. Cerino, R.M. Roccasecca, S. Acali, G. Filocamo, C. Traboni, A. Nicosia, R. Cortese, and A. Vitelli, The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *Embo J*, 2002. 21, 5017-25.
72. Evans, M.J., T. von Hahn, D.M. Tscherne, A.J. Syder, M. Panis, B. Wolk, T. Hatzioannou, J.A. McKeating, P.D. Bieniasz, and C.M. Rice, Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, 2007. 446, 801-5.
73. Zheng, A., F. Yuan, Y. Li, F. Zhu, P. Hou, J. Li, X. Song, M. Ding, and H. Deng, Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol*, 2007. 81, 12465-71.
74. Rocha-Perugini, V., C. Montpellier, D. Delgrange, C. Wychowski, F. Helle, A. Pillez, H. Drobecq, F. Le Naour, S. Charrin, S. Levy, E. Rubinstein, J. Dubuisson, and L. Cocquerel, The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS ONE*, 2008. 3, 1866.
75. Blanchard, E., S. Belouzard, L. Goueslain, T. Wakita, J. Dubuisson, C. Wychowski, and Y. Rouille, Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*, 2006. 80, 6964-72.
76. Bartosch, B., A. Vitelli, C. Granier, C. Goujon, J. Dubuisson, S. Pascale, E. Scarselli, R. Cortese, A. Nicosia, and F.L. Cosset, Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem*, 2003. 278, 41624-30.
77. Hsu, M., J. Zhang, M. Flint, C. Logvinoff, C. Cheng-Mayer, C.M. Rice, and J.A. McKeating, Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100, 7271-6.

-
78. Meertens, L., C. Bertaux, and T. Dragic, Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J Virol*, 2006. 80, 11571-8.
 79. Tscherne, D.M., C.T. Jones, M.J. Evans, B.D. Lindenbach, J.A. McKeating, and C.M. Rice, Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J Virol*, 2006. 80, 1734-41.
 80. Penin, F., J. Dubuisson, F.A. Rey, D. Moradpour, and J.M. Pawlotsky, Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*, 2004. 39, 5-19.
 81. Brown, R.S., Hepatitis C and liver transplantation. *Nature*, 2005. 436, 973-8.
 82. Nierhoff D., G.T., Diagnostik und natürlicher Verlauf der Hepatitis A-E. *Gastroenterologe*, 2006. 2, 101-108.
 83. Seeff, L.B., Natural history of hepatitis C. *Am J Med*, 1999. 107(6B): p. 10S-15S.
 84. Poynard, T., M.F. Yuen, V. Ratziu, and C.L. Lai, Viral hepatitis C. *Lancet*, 2003. 362, 2095-100.
 85. Hadziyannis, S.J., H. Sette, Jr., T.R. Morgan, V. Balan, M. Diago, P. Marcellin, G. Ramadori, H. Bodenheimer, Jr., D. Bernstein, M. Rizzetto, S. Zeuzem, P.J. Pockros, A. Lin, and A.M. Ackrill, Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med*, 2004. 140, 346-55.
 86. NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002. *NIH Consensus State Sci Statements*, 2002. 19, 1-46.
 87. Theofilopoulos, A.N., R. Baccala, B. Beutler, and D.H. Kono, Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol*, 2005. 23, 307-36.
 88. Feld, J.J. and J.H. Hoofnagle, Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*, 2005. 436, 967-72.
 89. McHutchison, J.G., K. Patel, P. Pockros, L. Nyberg, S. Pianko, R.Z. Yu, F.A. Dorr, and T.J. Kwoh, A phase I trial of an antisense inhibitor of hepatitis C virus (ISIS 14803), administered to chronic hepatitis C patients. *J Hepatol*, 2006. 44, 88-96.
 90. Jarczak, D., M. Korf, C. Beger, M.P. Manns, and M. Kruger, Hairpin ribozymes in combination with siRNAs against highly conserved hepatitis C virus sequence inhibit RNA replication and protein translation from hepatitis C virus subgenomic replicons. *Febs J*, 2005. 272, 5910-22.
 91. Kanda, T., R. Steele, R. Ray, and R.B. Ray, Small interfering RNA targeted to hepatitis C virus 5' nontranslated region exerts potent antiviral effect. *J Virol*, 2007. 81, 669-76.
 92. De Clercq, E., The design of drugs for HIV and HCV. *Nat Rev Drug Discov*, 2007. 6, 1001-18.

93. Lamarre, D., P.C. Anderson, M. Bailey, P. Beaulieu, G. Bolger, P. Bonneau, M. Bos, D.R. Cameron, M. Cartier, M.G. Cordingley, A.M. Faucher, N. Goudreau, S.H. Kawai, G. Kukolj, L. Lagace, S.R. LaPlante, H. Narjes, M.A. Poupert, J. Rancourt, R.E. Sentjens, R. St George, B. Simoneau, G. Steinmann, D. Thibeault, Y.S. Tsantrizos, S.M. Weldon, C.L. Yong, and M. Llinas-Brunet, An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature*, 2003. 426, 186-9.
94. Pawlotsky, J.M. and J.G. McHutchison, Hepatitis C. Development of new drugs and clinical trials: promises and pitfalls. Summary of an AASLD hepatitis single topic conference, Chicago, IL, February 27-March 1, 2003. *Hepatology*, 2004. 39, 554-67.
95. Roberts S., C.G., Shaw D., Interim results of a multiple ascending dose study of R1626, a novel nucleoside analog targeting hcv polymerase in chronic HCV patients. *Journal of Hepatology* 2006. 44, 269.
96. Dieterich, D., E. Lawitz, and T. Nguyen, Early clearance of HCV RNA with valopicitabine (NM283) plus PEG-Interferon in treatment-naïve patients with HCV-1 infection: First results from a phase IIb trial. *Journal of Hepatology* 2006. 44, 271-272.
97. Afdhal, N., C. O'Brien, E. Godofsky, and M. Rodriguez-Torres, Valopicitabine (NM283), alone or with peginterferon, compared to peg interferon/ribavirin (pegifn/RBV) re-treatment in hepatitis patients with prior non-response to PEGIFN/RBV: Week 24 results. *Journal of Hepatology* 2006. 44, 19.
98. McHutchison, J.G., R. Bartenschlager, K. Patel, and J.M. Pawlotsky, The face of future hepatitis C antiviral drug development: recent biological and virologic advances and their translation to drug development and clinical practice. *J Hepatol*, 2006. 44, 411-21.
99. Goto, K., K. Watashi, T. Murata, T. Hishiki, M. Hijikata, and K. Shimotohno, Evaluation of the anti-hepatitis C virus effects of cyclophilin inhibitors, cyclosporin A, and NIM811. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 343, 879-84.
100. Ma, S., J.E. Boerner, C. TiongYip, B. Weidmann, N.S. Ryder, M.P. Cooreman, and K. Lin, NIM811, a cyclophilin inhibitor, exhibits potent in vitro activity against hepatitis C virus alone or in combination with alpha interferon. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006. 50, 2976-82.
101. Dhanasekaran, M., P.W. Baures, S. VanCompernelle, S. Todd, and O. Prakash, Structural characterization of peptide fragments from hCD81-LEL. *J Pept Res*, 2003. 61, 80-9.
102. VanCompernelle, S.E., A.V. Wiznycia, J.R. Rush, M. Dhanasekaran, P.W. Baures, and S.C. Todd, Small molecule inhibition of hepatitis C virus E2 binding to CD81. *Virology*, 2003. 314, 371-80.
103. Ito, N., S. Kawata, S. Tamura, H. Nakajima, S. Kiso, A. Saeki, T. Oue, T. Hanafusa, and Y. Matsuzawa, Amino acid sequence of EC2 domain in CD81 is highly conserved in Japanese subjects. *Hepatology*, 2000. 31, 544-5.

-
104. Kitadokoro, K., M. Ponassi, G. Galli, R. Petracca, F. Falugi, G. Grandi, and M. Bolognesi, Subunit association and conformational flexibility in the head subdomain of human CD81 large extracellular loop. *Biol Chem*, 2002. 383, 1447-52.
105. Kitadokoro, K., D. Bordo, G. Galli, R. Petracca, F. Falugi, S. Abrignani, G. Grandi, and M. Bolognesi, CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *Embo J*, 2001. 20, 12-8.
106. Kitadokoro, K., G. Galli, R. Petracca, F. Falugi, G. Grandi, and M. Bolognesi, Crystallization and preliminary crystallographic studies on the large extracellular domain of human CD81, a tetraspanin receptor for hepatitis C virus. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2001. 57, 156-8.
107. Levy, S. and T. Shoham, The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5, 136-48.
108. Seigneuret, M., Complete predicted three-dimensional structure of the facilitator transmembrane protein and hepatitis C virus receptor CD81: conserved and variable structural domains in the tetraspanin superfamily. *Biophys J*, 2006. 90, 212-27.
109. Drummer, H.E., K.A. Wilson, and P. Pountourios, Identification of the hepatitis C virus E2 glycoprotein binding site on the large extracellular loop of CD81. *J Virol*, 2002. 76, 11143-7.
110. Bertaux, C. and T. Dragic, Different domains of CD81 mediate distinct stages of hepatitis C virus pseudoparticle entry. *J Virol*, 2006. 80, 4940-8.
111. Neugebauer, A., R.W. Hartmann, and C.D. Klein, Prediction of protein-protein interaction inhibitors by chemoinformatics and machine learning methods. *J Med Chem*, 2007. 50, 4665-8.
112. Lipinski, C.A., F. Lombardo, B.W. Dominy, and P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001. 46, 3-26.
113. Dale, H.H., The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. *J. Pharmacol.*, 1914. 6, 147-190.
114. Nachmansohn, D. and M.A. Rothenberg, Cholinesterase I. The specificity of the enzyme in nerve tissue. *J. Biol. Chem.*, 1945. 158, 653-666.
115. Brufani, M., Rational design of cholinesterase inhibitors, in *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors*. Giacobini E. ed. 2000, Martin Dunitz Ltd. London. 28.
116. Duncan, G. and D.J. Collison, Role of the non-neuronal cholinergic system in the eye: a review. *Life Sci*, 2003. 72, 2013-9.
117. Nizri, E., I. Wirguin, and T. Brenner, The role of cholinergic balance perturbation in neurological diseases. *Drug News Perspect*, 2007. 20, 421-9.

118. Cincotta, S.L., M.S. Yorek, T.M. Moschak, S.R. Lewis, and J.S. Rodefer, Selective nicotinic acetylcholine receptor agonists: potential therapies for neuropsychiatric disorders with cognitive dysfunction. *Curr Opin Investig Drugs*, 2008. 9, 47-56.
119. Langmead, C.J., J. Watson, and C. Reavill, Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. *Pharmacol Ther*, 2008. 117, 232-43.
120. Gangloff, A., A. Garneau, Y.W. Huang, F. Yang, and S.X. Lin, Human oestrogenic 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase specificity: enzyme regulation through an NADPH-dependent substrate inhibition towards the highly specific estrone reduction. *Biochem J*, 2001. 356, 269-76.
121. Bulun, S.E., S. Yang, Z. Fang, B. Gurates, M. Tamura, J. Zhou, and S. Sebastian, Role of aromatase in endometrial disease. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2001. 79, 19-25.
122. Langer, L.J. and L.L. Engel, Human placental estradiol-17 beta dehydrogenase. I. Concentration, characterization and assay. *J Biol Chem*, 1958. 233, 583-8.
123. Alho-Richmond, S., A. Lilienkampf, and K. Wahala, Active site analysis of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 enzyme complexes with SPROUT. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2006. 248, 208-213.
124. Lin, S.X., F. Yang, J.Z. Jin, R. Breton, D.W. Zhu, V. Luu-The, and F. Labrie, Subunit identity of the dimeric 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase from human placenta. *J Biol Chem*, 1992. 267, 16182-7.
125. Peltoketo, H., V. Isomaa, O. Maentausta, and R. Vihko, Complete amino acid sequence of human placental 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deduced from cDNA. *FEBS Lett*, 1988. 239, 73-7.
126. Penning, T.M., Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocr Rev*, 1997. 18, 281-305.
127. Jin, J.Z. and S.X. Lin, Human estrogenic 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase: predominance of estrone reduction and its induction by NADPH. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. 259, 489-93.
128. Alho-Richmond, S., A. Lilienkampf, and K. Wahala, Active site analysis of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 enzyme complexes with SPROUT. *Mol Cell Endocrinol*, 2006. 248, 208-13.
129. Labrie, F., V. Luu-The, S.X. Lin, C. Labrie, J. Simard, R. Breton, and A. Belanger, The key role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids*, 1997. 62, 148-58.
130. Nahoum, V., A. Gangloff, R. Shi, and S.X. Lin, How estrogen-specific proteins discriminate estrogens from androgens: a common steroid binding site architecture. *Faseb J*, 2003. 17, 1334-6.

-
131. Ghosh, D., V.Z. Pletnev, D.W. Zhu, Z. Wawrzak, W.L. Duax, W. Pangborn, F. Labrie, and S.X. Lin, Structure of human estrogenic 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase at 2.20 Å resolution. *Structure*, 1995. 3, 503-13.
132. Breton, R., D. Housset, C. Mazza, and J.C. Fontecilla-Camps, The structure of a complex of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase with estradiol and NADP⁺ identifies two principal targets for the design of inhibitors. *Structure*, 1996. 4, 905-15.
133. Filling, C., K.D. Berndt, J. Benach, S. Knapp, T. Prozorovski, E. Nordling, R. Ladenstein, H. Jornvall, and U. Oppermann, Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *J Biol Chem*, 2002. 277, 25677-84.
134. Hwang, C.C., Y.H. Chang, C.N. Hsu, H.H. Hsu, C.W. Li, and H.I. Pon, Mechanistic roles of Ser-114, Tyr-155, and Lys-159 in 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*. *J Biol Chem*, 2005. 280, 3522-8.
135. Rotanski, K., Über Uterusdrüsen-Neubildung in Uterus und Ovarialsarkomen. *Zentralblatt der Gesellschaft der Ärzte in Wien*, 1860. 37, 577-593.
136. Akkoc, Y., M. Uyar, J. Oncu, Z. Ozcan, and B. Durmaz, Complex regional pain syndrome in a patient with spinal cord injury: management with pulsed radiofrequency lumbar sympatholysis. *Spinal Cord*, 2008. 46, 82-4.
137. Leyendecker, G., G. Kunz, M. Noe, M. Herbertz, and G. Mall, Endometriosis: a dysfunction and disease of the archimetra. *Hum Reprod Update*, 1998. 4(5): p. 752-62.
138. Sampson, J.A., Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynaecol*, 1927. 10, 649-664.
139. Gruenwald, P., Origin of endometriosis from the mesenxhyme of the coelomic walls. *Am J Obstet Gynaecol*, 1942. 44, 470-476.
140. Meyer, R., Über den Stand der Frage der Adenomyositis und Adenomyoma im allgemeinen und insbesondere über Adenomyositis und Adenomyometritis sarcomatosa. *Zentrbl Gynäkol*, 1919. 43, 745-750.
141. Witz, C.A., Pathogenesis of endometriosis. *Gynecol Obstet Invest*, 2002. 53, 52-62.
142. Halban, J., Metastatic hysteroadenosis. *Wien Wochenschr.*, 1924. 37,1205-1206.
143. Javert, C.T., The spread of benign and malignant endometrium in the lymphatic system with a note on coexisting vascular involvement. *Am J Obstet Gynecol*, 1952. 64, 780-806.
144. Ota, H., S. Igarashi, M. Sasaki, and T. Tanaka, Distribution of cyclooxygenase-2 in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod*, 2001. 16, 561-6.
145. Chishima, F., S. Hayakawa, K. Sugita, N. Kinukawa, S. Aleemuzzaman, N. Nemoto, T. Yamamoto, and M. Honda, Increased expression of cyclooxygenase-2 in local lesions of endometriosis patients. *Am J Reprod Immunol*, 2002. 48, 50-6.

146. Rice, V.M., Conventional medical therapies for endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. 955, 343-52; discussion 389-93, 396-406.
147. Attar, E. and S.E. Bulun, Aromatase and other steroidogenic genes in endometriosis: translational aspects. *Hum Reprod Update*, 2006. 12, 49-56.
148. Antoniou, A.C., P.D. Pharoah, G. McMullan, N.E. Day, B.A. Ponder, and D. Easton, Evidence for further breast cancer susceptibility genes in addition to BRCA1 and BRCA2 in a population-based study. *Genet Epidemiol*, 2001. 21, 1-18.
149. Evans, D.G., I.S. Fentiman, K. McPherson, D. Asbury, B.A. Ponder, and A. Howell, Familial breast cancer. *Bmj*, 1994. 308, 183-7.
150. McPherson, K., C.M. Steel, and J.M. Dixon, ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *Bmj*, 2000. 321, 624-8.
151. Bijker, N., P. Meijnen, J.L. Peterse, J. Bogaerts, I. Van Hoorebeek, J.P. Julien, M. Gennaro, P. Rouanet, A. Avril, I.S. Fentiman, H. Bartelink, and E.J. Rutgers, Breast-conserving treatment with or without radiotherapy in ductal carcinoma-in-situ: ten-year results of European Organisation for Research and Treatment of Cancer randomized phase III trial 10853--a study by the EORTC Breast Cancer Cooperative Group and EORTC Radiotherapy Group. *J Clin Oncol*, 2006. 24, 3381-7.
152. Clarke, M., R. Collins, S. Darby, C. Davies, P. Elphinstone, E. Evans, J. Godwin, R. Gray, C. Hicks, S. James, E. MacKinnon, P. McGale, T. McHugh, R. Peto, C. Taylor, and Y. Wang, Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*, 2005. 366, 2087-106.
153. Cutuli, B., C. Cohen-Solal-le Nir, B. de Lafontan, H. Mignotte, V. Fichet, R. Fay, V. Servent, S. Giard, C. Charra-Brunaud, C. Lemanski, H. Auvray, S. Jacquot, and J.C. Charpentier, Breast-conserving therapy for ductal carcinoma in situ of the breast: the French Cancer Centers' experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2002. 53, 868-79.
154. WHO, Global burden of cancer.
www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html, 2007.
155. Bulun, S.E., K. Zeitoun, K. Takayama, L. Noble, D. Michael, E. Simpson, A. Johns, M. Putman, and H. Sasano, Estrogen production in endometriosis and use of aromatase inhibitors to treat endometriosis. *Endocr Relat Cancer*, 1999. 6, 293-301.
156. Chishima, F., S. Hayakawa, T. Yamamoto, M. Sugitani, M. Karasaki-Suzuki, K. Sugita, and N. Nemoto, Expression of inducible microsomal prostaglandin E synthase in local lesions of endometriosis patients. *Am J Reprod Immunol*, 2007. 57, 218-26.
157. Dassen, H., C. Punyadeera, R. Kamps, B. Delvoux, A. Van Langendonck, J. Donnez, B. Husen, H. Thole, G. Dunselman, and P. Groothuis, Estrogen metabolizing enzymes in endometrium and endometriosis. *Hum Reprod*, 2007. 22, 3148-58.

158. Sasano, H., T. Suzuki, J. Takeyama, H. Utsunomiya, K. Ito, N. Ariga, and T. Moriya, 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human breast and endometrial carcinoma. A new development in intracrinology. *Oncology*, 2000. 59, 5-12.
159. Vihko, P., V. Isomaa, and D. Ghosh, Structure and function of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2. *Mol Cell Endocrinol*, 2001. 171, 71-6.
160. Ehmer, P.B., M. Bureik, R. Bernhardt, U. Muller, and R.W. Hartmann, Development of a test system for inhibitors of human aldosterone synthase (CYP11B2): screening in fission yeast and evaluation of selectivity in V79 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2002. 81, 173-9.
161. Hartmann, R.W., U. Muller, and P.B. Ehmer, Discovery of selective CYP11B2 (aldosterone synthase) inhibitors for the therapy of congestive heart failure and myocardial fibrosis. *Eur J Med Chem*, 2003. 38, 363-6.
162. Ishichi, Y., M. Sasaki, M. Setoh, T. Tsukamoto, S. Miwatashi, H. Nagabukuro, S. Okanishi, S. Imai, R. Saikawa, T. Doi, and Y. Ishihara, Novel acetylcholinesterase inhibitor as increasing agent on rhythmic bladder contractions: SAR of 8-{3-[1-(3-fluorobenzyl)piperidin-4-yl]propanoyl}-1,2,5,6-tetrahydro-4H-pyrrolo[3,2,1-ij]quinolin-4-one (TAK-802) and related compounds. *Bioorg Med Chem*, 2005. 13, 1901-11.
163. Ellman, G.L., A. Burkhalter, and J. Ladou, A fluorometric method for the determination of hippuric acid. *J Lab Clin Med*, 1961. 57, 813-8.
164. Saloniemi, T., T. Lamminen, K. Huhtinen, M. Welsh, P. Saunders, H. Kujari, and M. Poutanen, Activation of androgens by hydroxysteroid (17beta) dehydrogenase 1 in vivo as a cause of prenatal masculinization and ovarian benign serous cystadenomas. *Mol Endocrinol*, 2007. 21, 2627-36.
165. Husen, B., K. Huhtinen, T. Saloniemi, J. Messinger, H.H. Thole, and M. Poutanen, Human hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 1 expression enhances estrogen sensitivity of MCF-7 breast cancer cell xenografts. *Endocrinology*, 2006. 147, 5333-9.
166. Becker, C.M., N. Rohwer, T. Funakoshi, T. Cramer, W. Bernhardt, A. Birsner, J. Folkman, and R.J. D'Amato, 2-methoxyestradiol inhibits hypoxia-inducible factor-1{alpha} and suppresses growth of lesions in a mouse model of endometriosis. *Am J Pathol*, 2008. 172, 534-44.
167. Einspanier, A., K. Lieder, A. Bruns, B. Husen, H. Thole, and C. Simon, Induction of endometriosis in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Mol Hum Reprod*, 2006. 12, 291-9.
168. Sam, K.M., R.P. Boivin, M.R. Tremblay, S. Auger, and D. Poirier, C16 and C17 derivatives of estradiol as inhibitors of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: chemical synthesis and structure-activity relationships. *Drug Des Discov*, 1998. 15, 157-80.

169. Hao, W. and R. Duggal, High-throughput screening of HCV RNA replication inhibitors by means of a reporter replicon system. *Methods Mol Biol*, 2009. 510, 243-50.
170. Cai, L. and M. Gochin, A novel fluorescence intensity screening assay identifies new low-molecular-weight inhibitors of the gp41 coiled-coil domain of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007. 51, 2388-95.

8. Danksagungen

Ich möchte mich bei Prof. Dr. R. W. Hartmann für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation am Institut für pharmazeutische und medizinische Chemie anfertigen zu dürfen und dadurch zu den Themengebieten dieses Arbeitskreises sowie der pharmazeutischen und medizinischen Chemie Zugang zu bekommen.

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. Christian Klein für die Unterstützung bedanken, die er mir hat zukommen lassen. Für die Zeit, die er sich für mich genommen und für die Mühe, die er sich gemacht hat.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich an der Stelle an die Mitarbeiter der inneren Medizin in Homburg (seit 2007 in Frankfurt) richten - ganz besonders an Dr. Albrecht Piiper und dessen Mitarbeiter und an Dr. Kronenberger. Ich bin dankbar für Ihre Unterstützung, für Anregungen und auch die angenehme Zusammenarbeit.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Bartenschlager für die Möglichkeit bedanken, an einem auf dem Gebiet der HCV-Forschung so renommierten Institut mitarbeiten und Erfahrung sammeln zu dürfen. Für die unvergleichlich schöne Arbeitsatmosphäre, wissenschaftliche Diskussionen, für die Unterstützung und Motivation bedanke ich mich bei den Mitarbeitern dieser Arbeitsgruppe.

Dr. Marcel Holzer gilt ein großes Dankeschön für seinen unerschütterlichen Optimismus, für die Ruhe und Gelassenheit, die er zu vermitteln vermag ebenso für die angenehme und an den entsprechenden Stellen nötige Ablenkung.

Dem gesamten ehemaligen Labor 1 einschließlich der wechselnden Praktikanten möchte ich mich für die stets unterhaltsamen und kurzweiligen Passagen in dem ansonsten doch recht eintönigen Laboralltag danken. Es ist schön zu sehen, dass man trotz hoher Leistungsansprüche den Spaß und die Freude am Leben nicht verlieren muss und selbst über kleine Dinge noch lachen kann.

Bei all denjenigen, die mich durch die Höhen und besonders bei denen, die mich durch die Tiefen der letzten Jahre begleitet haben, stehe ich in einer tiefen Schuld, die sich durch Worte, ein herzliches Dankeschön, eine Umarmung...nicht ausdrücken lässt.