

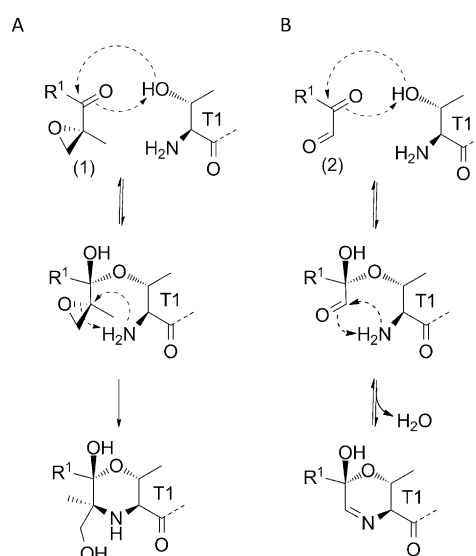
Ein systematischer Vergleich peptidischer Proteasominhibitoren unterstreicht α -Ketoamid als vielversprechende elektrophile Leitstruktur**

Martin L. Stein, Haissi Cui, Philipp Beck, Christian Dubiella, Constantin Voss, Achim Krüger, Boris Schmidt und Michael Groll*

Abstract: Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) wurde in akademischer wie pharmazeutischer Forschung erfolgreich für onkologische und immunologische Anwendungen adressiert. Typische Proteasominhibitoren basieren auf einem peptidischen Rückgrat, das mit einem elektrophilen C-Terminus zur Bindung an die aktiven proteolytischen Zentren gekuppelt ist. Obwohl der peptidische Anteil viel Interesse bezüglich der Untereinheitenselektivität hervorgerufen hat, wird die Wirksamkeit und biologische Stabilität der Substanzen entscheidend durch die reaktiven Kopfgruppen geprägt. In dieser Studie wurde daher eine systematische Untersuchung mit In-vitro-, In-vivo- und strukturbiochemischen Methoden durchgeführt, um die Auswirkungen unterschiedlicher Funktionalitäten und chemischer Reaktivitäten aufzudecken. Dies ermöglichte die Einführung und Charakterisierung der Klasse der α -Ketoamide als potenteste reversible Inhibitoren mit möglichen Anwendungen für die Behandlung von soliden Tumoren und Autoimmunerkrankungen.

Die Zulassung von Carfilzomib (Kyprolis) für multiples Myelom und Mantelzelllymphom als Proteasominhibitor der zweiten Generation durch die FDA im Jahr 2012 hat das 20S-Proteasom (Kernpartikel; KP) aus dem nichtlysosomalen Proteinabbauweg erneut als mögliches Angriffsziel für Krebserkrankungen bestätigt.^[1] Zudem wurde durch die Entwicklung des entzündungshemmenden KP-Inhibitors PR-957 der Weg für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen durch die Modulierung der proteasomalen Signalgebungsfunktion bereitet.^[2] Carfilzomib und PR-957 tragen als gemeinsames Strukturmerkmal das α,β' -Epoxyketon-Elektrophil, welches von dem Naturstoff Epoxomicin ableitet.^[3]

Dieses Leitmotiv hat sich gegen die hochreaktive Boronsäure des ersten klinisch zugelassenen Inhibitors Bortezomib (Velcade)^[4] durchgesetzt, indem es die Bivalenz des katalytisch aktiven Thr1 in den proteasomalen Substratbindekanälen adressiert (Schema 1).^[5] Durch diesen Bindemodus



Schema 1. Reaktionsmechanismus von α,β' -Epoxyketonen (A) und α -Ketoaldehyden (B) mit dem katalytisch aktiven Thr1.

werden Cystein-, Aspartat und Metalloproteasen von Epoxyketonen nicht betroffen, was sich in einem stark verbesserten Nebenwirkungsprofil niederschlägt.^[6] Dennoch weist auch diese zweite Generation an Proteasominhibitoren einen irreversiblen Bindemodus ähnlich der Reaktivität von Bortezomib auf,^[5] was mutmaßlich die Durchdringung von festem Gewebe mindert und die Einsetzbarkeit auf verschiedene Arten von Blutkrebs beschränkt.^[7] Daher war das Ziel dieser Forschungsarbeit, die bivalente Leitstruktur von Epoxyketonen zu einer reversiblen Funktionalität umzuformen, indem wir die Verbindungsklasse der α -Ketoaldehyde einführten.^[8] Unerwarteterweise zeigten spätere Experimente, dass α -Ketoaldehyde sowohl ein wesentlich geringeres Inhibitions-potenzial als auch eine verminderte Zytotoxizität gegen Krebszelllinien aufweisen, was diese Substanzklasse bereits im Vorfeld von klinischen Studien ausschließt.

Um diesen Reaktivitätsverlust näher zu beleuchten, wurde eine systematische Analyse der biochemischen Auswirkungen verschiedener C-terminaler Elektrophile in vitro

[*] M. L. Stein, P. Beck, C. Dubiella, Prof. Dr. M. Groll
Center for Integrated Protein Science am Department Chemie
Lehrstuhl für Biochemie, TU München (Deutschland)
E-Mail: michael.groll@ch.tum.de

H. Cui, Prof. Dr. A. Krüger
Institut für experimentelle Onkologie und Therapieforschung
TU München (Deutschland)

C. Voss, Prof. Dr. B. Schmidt
Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie
TU Darmstadt (Deutschland)

[**] Wir danken der Belegschaft an der PXI am Paul-Scherrer-Institut, Swiss Light Source (Villigen, Schweiz) für ihre Hilfe bei der Datensammlung. Diese Arbeit wurde teilweise durch die DFG (GRK1657, Projekt 2E) finanziert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201308984> zu finden.

und in vivo durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde das Z-Leu-Leu-Leu-Rückgrat des ausführlich charakterisierten aldehydischen Proteasominhibitors MG132^[9] (**1**) mit unterschiedlichen elektrophilen Kopfgruppen versehen: einem Ketoaldehyd (**2**), einem α,β' -Epoxyketon (**3**), einer Boronsäure (**4**) und einem Vinylsulfon (**5**; Abbildung 1A). Mit

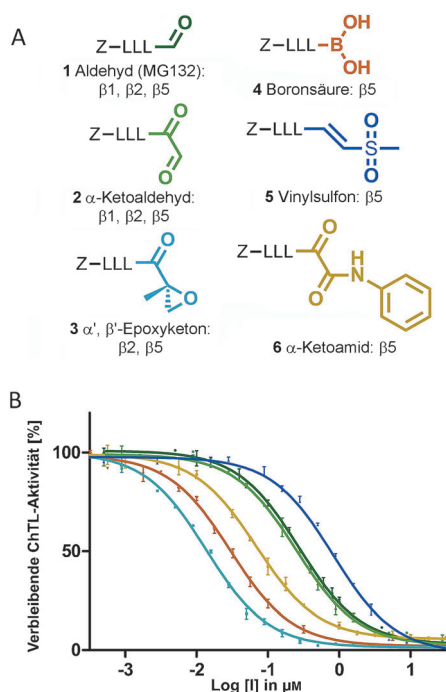


Abbildung 1. Vergleichende Kopfgruppenanalyse durch In-vitro-Experimente. A) Verschiedene Elektrophile wurden an ein Z-Leu-Leu-Leu-Rückgrat gekuppelt, was zu unterschiedlichen Selektivitätsverhältnissen für die aktiven Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ führte. B) IC_{50} -Messungen der ChTL-Aktivität des Proteasoms nach Zugabe einer Verdünnungsreihe der jeweiligen Inhibitoren. Das hochreaktive Epoxyketon **3** und die Boronsäure **4** repräsentieren die stärksten Inhibitoren unter allen Verbindungen, wohingegen das α -Ketoamid **6** den potentesten reversiblen Inhibitor darstellt. Dabei übertrifft letzteres sogar die reaktiven Aldehyde, welche beide nur mittlere Inhibition aufweisen.

Ausnahme der kommerziell verfügbaren Verbindung **5** wurden alle Inhibitoren durch eine Kombination von klassischer Peptidsynthese und spezifischen Syntheserouten für die elektrophilen Kopfgruppen hergestellt. Im Fall von **3** und **4** wurden die funktionellen Gruppen separat synthetisiert und in einem konvergenten Ansatz an das Peptidgerüst gekuppelt.^[10] Dagegen wurde der Aldehyd **1** auf einem zuvor erzeugten Leucinolterminus durch Oxidation mit 2-Iodoxybenzoesäure (IBX) aufgebaut.^[11] **2** konnte aus **1** durch eine Grignard-Reaktion mit Iodoform gefolgt von einer Oxidation und Hydrolyse des resultierenden β -Dioldalkohols erhalten werden^[12] (siehe die Hintergrundinformationen).

Nachdem alle KP-Inhibitoren zur Verfügung standen, wurden IC_{50} -Messungen der hauptsächlich betroffenen chymotrypsinartigen Aktivität (ChTL), welche durch das katalytisch aktive Thr1-Nukleophil der $\beta 5$ -Untereinheit vermittelt wird, durchgeführt (Abbildung 1B).^[13] Alle Substanzen inhibierten das ChTL-Aktivitätszentrum, wobei **3** (15 nM) und **4**

(27 nM) die besten Werte aufwiesen. Das weniger reaktive Vinylsulfon **5** markierte den unteren Rand des Spektrums mit einem Wert von 780 nM. Überraschenderweise zeigten die Aldehyde **1** und **2** beinahe gleiche Inhibitionsstärken von 270 und 244 nM. Trotz des entropischen und enthalpischen Beitrags durch die Schiff'sche Kondensationsreaktion ist **2** nicht mit einem höheren Inhibitions Potenzial ausgestattet. Dies begründete unsere Vermutung, dass die Reaktivität der terminalen Aldehyde durch Hydratationseffekte vermindert sein könnte, und wir veränderten das Ketoaldehyd zu einem α -Ketoamid (**6**, Abbildung 1A).^[14] Dazu wurde **1** mit Phenylisocyanid zur Reaktion gebracht und das erhaltene α -Hydroxyamid durch IBX oxidiert^[15] (siehe die Hintergrundinformationen). **6** enthält ein planares konjugiertes π -Elektronensystem, welches vom Phenylring über die Amidbindung bis hin zur α -Ketogruppe reicht. Dabei wird die bivalente Reaktivität und Reversibilität von **2** erhalten, doch mit minimaler Hydratation beider Carbonyleinheiten (siehe die Hintergrundinformationen). Zudem bieten α -Ketoamide die Möglichkeit auch die „gestrichene“ Seite des proteasomalen Bindekanals zu nutzen, indem sie mit ihrem C-Terminus in die S1'-Tasche vorstoßen. Alle bis heute genutzten peptidischen KP-Modulatoren binden dagegen ausschließlich in die „nichtgestrichene“ Seite des Proteasombindekanals.^[16] Jedoch begründet der endoproteolytische Charakter des Proteasoms die Vorstellung, dass Liganden, welche sowohl die gestrichene als auch die nichtgestrichene Seite dieses Kanals belegen, sowohl erhöhte Selektivität als auch gesteigertes Inhibitions Potenzial aufweisen. Erstaunlicherweise war die Bindestärke von **6** deutlich auf 70 nM verbessert; dieser Wert wird nur noch von den beiden irreversiblen Inhibitoren **3** und **4** übertroffen.^[17]

Ermutigt durch diese Ergebnisse versuchten wir, die molekularen Hintergründe für diese extrem unterschiedlichen Aktivitäten der KP-Inhibitoren aufzudecken und das Bindeprofil an Thr1O^y auf atomarer Ebene zu analysieren. Dafür wurde das peptidische Gerüst der Substanzen identisch gehalten, was die Betrachtung des isolierten Effekts der elektrophilen Kopfgruppen ermöglichte und die Hefe-KP/Inhibitor-Strukturen aller Verbindungen mit Auflösungen von mindestens 3.0 Å und R_{frei} -Werten unter 25% bestimmt (Abbildung 2, Tabellen ST1 und ST2). Alle Hefe-KP-Kristalle wurden gleichermaßen in 2 mM der jeweiligen Inhibitoren für 24 h eingelegt. Datensätze wurden am Synchrotron der SLS (Paul-Scherrer-Institut, Villigen, Schweiz) aufgenommen; die Datenprozessierung und die Strukturverfeinerung wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt.^[18]

Eine Analyse der Elektronendichtekarten zeigt, dass jeder Ligand zumindest den für alle günstigen Substratkanal der $\beta 5$ -Untereinheit belegt. Interessanterweise binden sowohl die Boronsäure **4** als auch das Vinylsulfon **5** spezifisch in das ChTL-Aktivitätszentrum, was Hypothesen widerspricht, welche die Selektivität eines Inhibitors auf die Reaktivität des Elektrophils zurückführen. Im Unterschied dazu sind die Carbonylverbindungen **1** und **2** in allen aktiven Zentren zu finden, während das Epoxyketon **3** nicht an $\beta 1$ bindet und das Ketoamid **6** eine starke Präferenz für $\beta 5$ zeigt. Diese unterschiedlichen Spezifitäten waren überraschend, da häufig angenommen wird, dass nur die Natur des Aminosäuregerüsts

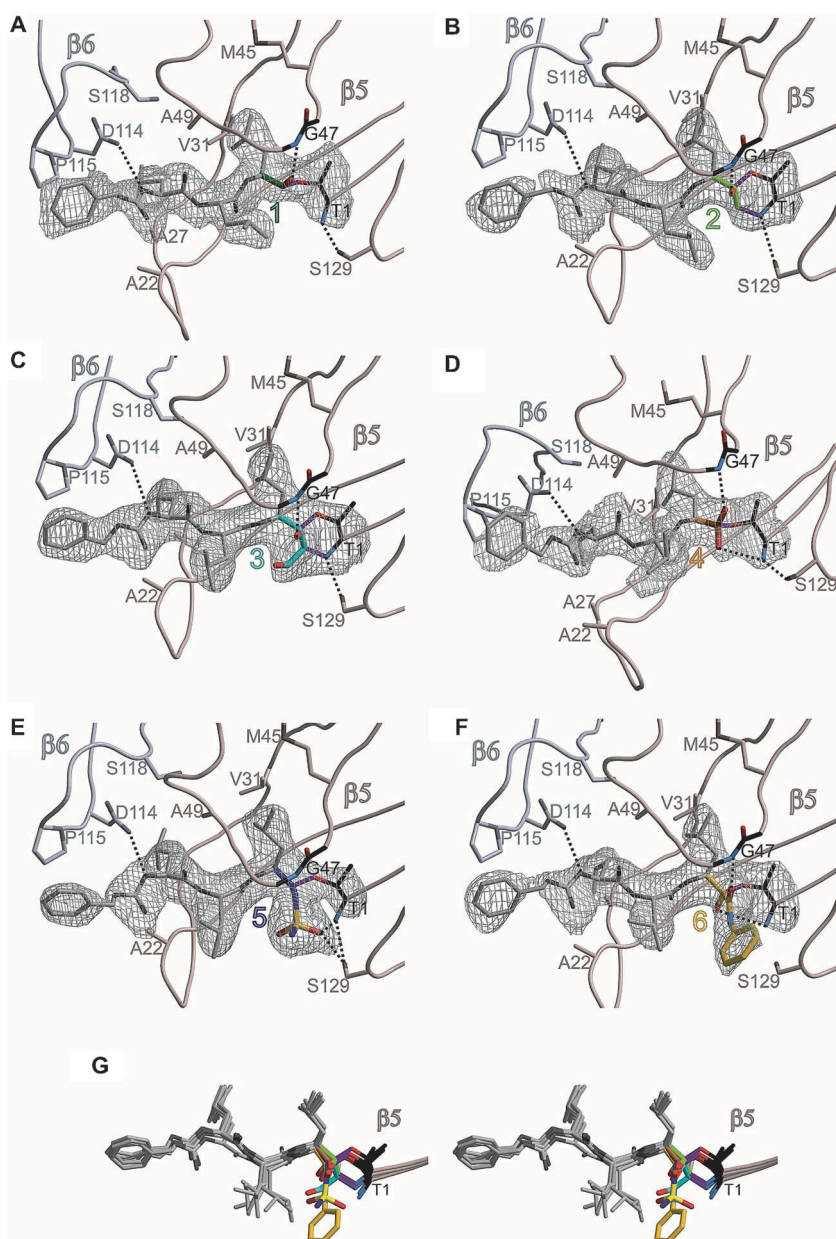


Abbildung 2. Kristallographische Bindeanalyse der elektrophilen Kopfgruppen. A–F) Die $2F_o - F_c$ -Elektronendichtekarten (graues Netz, 1σ) der jeweiligen Inhibitoren, gebunden an die aktive $\beta 5$ -Untereinheit. Wasserstoffbrücken sind durch gestrichelten Linien angedeutet. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf Löwe et al.^[19] Zusätzliche Stereoabbildungen befinden sich in den Hintergrundinformationen. G) Die Strukturüberlagerung aller Inhibitoren zeigt, dass die Liganden intensiv mit den S1- und S3-Taschen wechselwirken, wohingegen die P2-Seitenketten nur von Lösungsmittelmolekülen umgeben sind und daher wahllose Orientierungen einnehmen. Die Koordinaten und Strukturfaktoren sind unter den Zugangs-codes in den Tabellen ST1 und ST2 zur Verfügung gestellt.

der Inhibitoren eine Untereinheitenselektivität bewirkt. Es ist bekannt, dass die Adressierung mehrerer Untereinheiten zu einer für die Behandlung onkologischer Erkrankungen wünschenswerten, erhöhten Zytotoxizität führt. Dagegen ist ein untereinheitenspezifischer Bindemodus eher für die Abschwächung des immunologischen Zweigs der proteasomalen Signalkaskade geeignet.

Im Folgenden analysierten wir somit die verschiedenen Bindemechanismen der Verbindungen an das KP. Wie erwartet reagieren sowohl die Boronsäure **4** als auch das Vinylsulfon **5** in einer irreversiblen Einstufenreaktion unter Bildung eines tetraedrischen Borataddukts und eines Ethers an Thr1O^y (Abbildung 2A,E). Die Carbonylgruppen dagegen bilden anfänglich ein Halbacetal oder Halbketal (siehe Abbildung 2A,B,F und die Hintergrundinformationen). Beide Aldehyde **1** und **2** werden auf ihrer *Re*-Seite angegriffen und bilden hierdurch eine Hydroxygruppe, mit der sie das Oxyanion-Loch um Gly47NH besetzen.^[19] Nachfolgend zu diesem initialen Andockprozess reagiert das bivalente Ketoaldehyd **2** in einem dem Epoxyketon **3** ähnlichen, aber reversiblen Mechanismus mittels seinem zweiten elektrophilen Kohlenstoff mit dem primären und N-terminalen Amin von Thr1 in der $\beta 5$ -Kette. Dies wird von einem Kondensations-schritt begleitet, welcher zu einem 3,6-Dihydro-2*H*-1,4-oxazin-Ringsystem führt (siehe Abbildung 2C und die Hintergrundinformationen). Obwohl das Ketoamid **6** dieselbe Andockreaktion wie die Aldehyde **1** und **2** durchläuft, wird es daraufhin von Thr1O^y auf seiner *Si*-Seite attackiert, was die Bildung einer Wasserstoffbrücke zwischen seiner Halbketalgruppe und Thr1N ermöglicht (Abbildung 2F). Unerwarteterweise bildet **6** nur eine kovalente Bindung mittels seiner Oxogruppe aus und besetzt das Oxyanion-Loch mit seiner terminalen Amid-Carbonylfunktion. Auf diese Weise positioniert sich der Phenylamid Terminus in der gestrichenen Seite des proteasomalen Substratbindekanals, was zuvor noch nie für peptidische Inhibitoren beobachtet wurde. Das delokalisierte Elektronensystem der N-Phenyl- α -ketoamid-Gruppe schafft ein starres, planares Gerüst, das einen beträchtlichen entropischen Effekt zur Bindung sowie eine enthalpische Stabilisierung durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit den hydrophoben Oberflächenanteilen von Ser129 und Tyr168 der $\beta 5$ -Untereinheit beiträgt. Die gewonnenen strukturellen Ergebnisse, kombiniert mit den IC₅₀-Messungen, illustrieren, dass ein energetisch begünstigter bivalenter Bindemechanismus, dessen Vorzüge teilweise, wie im Fall von **2** durch Hydratationseffekte zunichte gemacht werden, von zusätzlichen Wechselwirkungen mit der gestrichenen Seite des KP-Bindekanals ausgeglichen werden kann.

Nächstes Ziel war diese In-vitro-Ergebnisse mit In-vivo-Effekten zu korrelieren. Dazu wurden alle Verbindungen in HeLa-Zellkulturassays untersucht und LD₅₀-Kurven mithilfe von Alamar-Blue-Zytotoxizitätsversuchen^[20] nach einer Inkubation von 48 h mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen aufgenommen (Abbildung 3 A). In Übereinstimmung mit ihrem In-vitro-Verhalten zeigten der Ketoaldehyd **2**^[21] und das Vinylsulfon **5** nur vernachlässigbare Effekte in den zell-

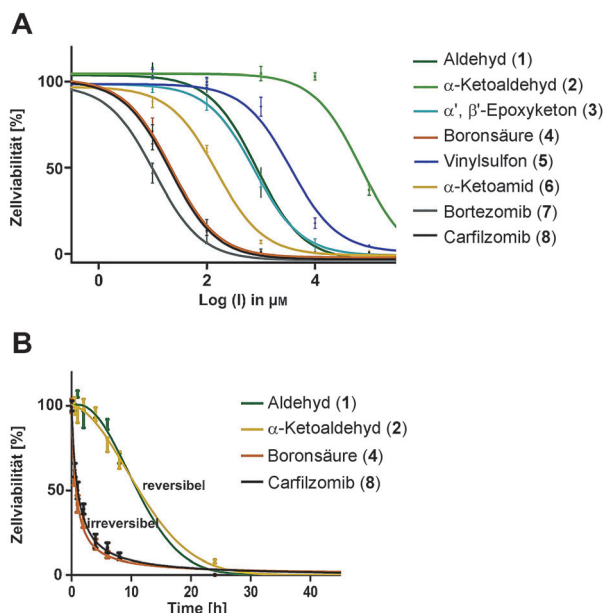


Abbildung 3. Zellkulturexperimente. A) LD₅₀-Kurven von HeLa-Zellen für die verschiedenen Verbindungen wurden mit Alamar-Blue-Assays bestimmt. B) Pulsexperimente mit den LD₉₀-Konzentrationen der jeweiligen Inhibitoren zu unterschiedlichen Inkubationszeiten mit nachfolgenden Waschschritten. Reversible Inhibitoren zeigen eine anfängliche Plateauphase, da sie mehr Zeit als nicht auswaschbare, irreversible Verbindungen zum Auslösen der Apoptose benötigen.

basierten Assays. Dagegen führte die Boronsäure **4** zur stärksten Zytotoxizität mit einem LD₅₀-Wert von 21 nM, der allerdings auch auf die beschriebene Kreuzreaktivität des Elektrophils zurückzuführen ist.^[6a] Beachtenswert ist die Stärke der Toxizität des Ketoamids **6** (254 nM). Damit übertrifft es sogar das Epoxyketon **3** (730 nM), welches sich mutmaßlich durch die Hydrolyse des Epoxids in wässriger Lösung bei 37 °C schnell inaktiviert und nur noch mit dem Aldehyd **1** gleichziehen kann (787 nM). Dieser Befund stimmt auch mit den Zytotoxizitätswerten der von der FDA zugelassenen Inhibitoren Bortezomib (**7**) und Carfilzomib (**8**) überein, obwohl deren unterschiedliche Peptidrückgrate den direkten Vergleich der Elektrophile erschwert. Schließlich wurde das kinetische Verhalten der Verbindungen durch Puls-Experimente untersucht (Abbildung 3B). Dazu wurden HeLa-Zellen mit den LD₉₀-Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert, die nach 48 h Inkubation gemessen worden waren. Allerdings wurden in dieser Versuchsanordnung die Inhibitoren nach unterschiedlichen Zeitintervallen durch Waschschritte entfernt. Nach einer finalen Inkubationszeit von 48 h konnte die Überlebensrate durch Alamar-Blue-Assays ermittelt

werden. Interessanterweise ist die Aktivität der irreversiblen KP-Blocker **3** und **4** durch eine exponentielle Degenerationsfunktion der Zellen beschreibbar, was den Schluss nahelegt, dass sie im Zytoplasma eingeschlossen bleiben und nicht durch Verdünnung mit frischem Medium ausgewaschen werden können. Umgekehrt dauerte das Anfangsplateau des Aldehyds **1** und des Ketoamids **6** aufgrund der reversiblen Bindemechanismen für ca. 6 h an, was den Zellen eine Regeneration ermöglichte, sofern sie nicht ausreichend beschädigt waren. Daher könnten diese Inhibitoren die Fähigkeit haben, tiefer in festes Gewebe einzudringen, was speziell Ketoamide zu einer vielversprechenden Verbindungsklasse für die Therapie einer größeren Zahl von Krebsarten macht als bisher von Bortezomib und Carfilzomib adressiert. Der komparative und systematische Ansatz dieser Studie hat, zum ersten Mal, für ein tieferes Verständnis des Anteils der elektrophilen Kopfgruppe an der In-vitro- und In-vivo-Potenz des eingesetzten Proteasominhibitors gesorgt. Zudem führte der Einbau der Ketoamidgruppe zur Identifizierung eines vielversprechenden reversiblen Leitmotivs, welches das Fehlen eines zweiten stark elektrophilen Zentrums durch die Bindung in die gestrichene Seite des proteasomalen Bindekanals ausgleicht.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die Bivalenz eines Elektrophils nicht notwendigerweise für starke Bindungsaffinitäten benötigt wird und von zusätzlichen nicht-kovalenten Wechselwirkungen überkompensiert werden kann. Das α-Ketoamid-Motiv erzeugt dabei ein neuartiges Inhibitionsprofil, welches die Anwendbarkeit von Proteasominhibitoren in chemo- und immunsuppressiven Therapien steigert.

Eingegangen am 15. Oktober 2013

Online veröffentlicht am 8. Januar 2014

Stichwörter: Ketoamid · Peptidelektrophile · Proteasom · Reversible Inhibitoren · Zellbiologie

- [1] P. Lawasut, D. Chauhan, J. Laubach, C. Hayes, C. Fabre, M. Maglio, C. Mitsiades, T. Hideshima, K. C. Anderson, P. G. Richardson, *Curr. Hematol. Malig. Rep.* **2012**, *7*, 258–266.
- [2] a) E. M. Huber, M. Basler, R. Schwab, W. Heinemeyer, C. J. Kirk, M. Groettrup, M. Groll, *Cell* **2012**, *148*, 727–738; b) T. Muchamuel, M. Basler, M. A. Aujay, E. Suzuki, K. W. Kalim, C. Lauer, C. Sylvain, E. R. Ring, J. Shields, J. Jiang, P. Shwonek, F. Parlati, S. D. Demo, M. K. Bennett, C. J. Kirk, M. Groettrup, *Nat. Med.* **2009**, *15*, 781–787.
- [3] L. Meng, R. Mohan, B. H. Kwok, M. Eloffsson, N. Sin, C. M. Crews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10403–10408.
- [4] P. G. Richardson, T. Hideshima, K. C. Anderson, *Cancer Control* **2003**, *10*, 361–369.
- [5] M. Groll, K. B. Kim, N. Kairies, R. Huber, C. M. Crews, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1237–1238.
- [6] a) S. Arastu-Kapur, J. L. Anderl, M. Kraus, F. Parlati, K. D. Shenk, S. J. Lee, T. Muchamuel, M. K. Bennett, C. Driessen, A. J. Ball, C. J. Kirk, *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 2734–2743; b) O. A. O'Connor, A. K. Stewart, M. Vallone, C. J. Molineaux, L. A. Kunkel, J. F. Gerecitano, R. Z. Orlowski, *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 7085–7091.
- [7] a) P. G. Richardson, B. Barlogie, J. Berenson, S. Singhal, S. Jagannath, D. Irwin, S. V. Rajkumar, G. Srkalovic, M. Alsina, R.

- Alexanian, D. Siegel, R. Z. Orlowski, D. Kuter, S. A. Limentani, S. Lee, T. Hideshima, D. L. Esseltine, M. Kauffman, J. Adams, D. P. Schenkein, K. C. Anderson, *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 2609–2617; b) M. J. Williamson, M. D. Silva, J. Terkelsen, R. Robertson, L. Yu, C. Xia, P. Hatsis, B. Bannerman, T. Babcock, Y. Cao, E. Kupperman, *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8*, 3234–3243.
- [8] M. A. Gräwert, N. Gallastegui, M. Stein, B. Schmidt, P. M. Kloetzel, R. Huber, M. Groll, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 563–566; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 542–544.
- [9] K. T. Bush, A. L. Goldberg, S. K. Nigam, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 9086–9092.
- [10] a) N. Sin, K. B. Kim, M. Elofsson, L. Meng, H. Auth, B. H. Kwok, C. M. Crews, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2283–2288; b) D. S. Matteson, K. M. Sadhu, M. L. Peterson, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 810–819; c) D. S. Matteson, A. A. Kandil, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 3831–3834.
- [11] M. Mroczkiewicz, K. Winkler, D. Nowis, G. Placha, J. Golab, R. Ostaszewski, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1509–1518.
- [12] A. Zall, D. Bensinger, B. Schmidt, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 1439–1447.
- [13] a) M. Orlowski, *Biochemistry* **1990**, *29*, 10289–10297; b) M. Groll, L. Ditzel, J. Löwe, D. Stock, M. Bochtler, H. Bartunik, R. Huber, *Nature* **1997**, *386*, 463–471.
- [14] S. Chatterjee, D. Dunn, S. Mallya, M. A. Ator, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2603–2606.
- [15] H. A. Braun, S. Umbreen, M. Groll, U. Kuckelkorn, I. Mlynarczyk, M. E. Wigand, I. Drung, P. M. Kloetzel, B. Schmidt, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 28394–28401.
- [16] a) P. Beck, C. Dubiella, M. Groll, *Biol. Chem.* **2012**, *393*, 1101–1120; b) A. Rentsch, D. Landsberg, T. Brodmann, L. Bülow, A. K. Girbig, M. Kalesse, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 5560–5599; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 5450–5488; c) E. Huber, M. Groll, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8838–8850; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8708–8720.
- [17] Boronsäure-Inhibitoren wirken langsam reversibel. Unsere In-vitro-Kinetikexperimente wurden mit einem 2-h-Zeitrahmen ausgeführt, während dessen keine Reversibilität zu beobachten war (siehe die Hintergrundinformationen).
- [18] M. Groll, R. Huber, *Methods Enzymol.* **2005**, *398*, 329–336.
- [19] J. Löwe, D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister, R. Huber, *Science* **1995**, *268*, 533–539.
- [20] S. Anoopkumar-Dukie, J. B. Carey, T. Conere, E. O'Sullivan, F. N. van Pelt, A. Allshire, *Br. J. Radiol.* **2005**, *78*, 945–947.
- [21] Da der α -Ketoaldehyd nur in geringen Ausbeuten synthetisiert werden konnte, wurde das käufliche Analogon Z-Leu-Leu-Tyr- α -Ketoaldehyd für das Experiment mit der höchsten Konzentration verwendet. Dabei ist zu beachten, dass dessen In-vitro-Aktivität in Einklang mit derjenigen von Z-Leu-Leu-Leu- α -Ketoaldehyd (**2**) ist.
- [22] J. Yang, Z. Wang, Y. Fang, J. Jiang, F. Zhao, H. Wong, M. K. Bennett, C. J. Molineaux, C. J. Kirk, *Drug. Metab. Dispos.* **2011**, *39*, 1873–1882.