

**Chemische Sonden** Hot PaperZitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, 60, 6799–6806

Internationale Ausgabe: doi.org/10.1002/anie.202016113

Deutsche Ausgabe: doi.org/10.1002/ange.202016113

Eine Strategie zur Ligandenselektion identifiziert chemische Sonden für die Markierung von SARS-CoV-2-Proteasen

*Lilian Peñalver, Philipp Schmid, Dávid Szamosvári, Stefan Schildknecht, Christoph Globisch, Kevin Sawade, Christine Peter und Thomas Böttcher**

Abstract: Aktivitätsbasierte Sonden sind wertvolle Werkzeuge in der chemischen Biologie. Nach wie vor ist es jedoch eine Herausforderung, molekulare Sonden zu entwickeln, die spezifisch an das aktive Zentrum eines bestimmten Enzyms binden. Wir stellen hier eine Strategie zur Ligandenselektion vor, die es ermöglicht, rasch elektrophile Sonden auf ausgewählte Enzyme zuzuschneiden, und zeigen in einer Machbarkeitsstudie ihre Anwendung für die beiden Cysteinproteasen von SARS-CoV-2. Die resultierenden Sonden markieren spezifisch die aktiven Zentren von 3CL^{pro} und PL^{pro} mit hinreichender Selektivität sowohl in einem lebenden Zellmodell als auch vor dem Hintergrund eines nativen menschlichen Proteoms. Durch die Nutzung der Sonden als Werkzeuge für das kompetitive Screening einer Bibliothek von Naturstoffen wurden Salvanolsäurederivate als vielversprechende 3CL^{pro}-Inhibitoren identifiziert. Unsere Strategie zur Ligandenselektion wird für die schnelle Entwicklung von maßgeschneiderten Sonden von großem Nutzen sein und die Entdeckung von Inhibitoren für eine Vielzahl von Zielproteinen ermöglichen, die auch über Coronavirus-Proteasen hinausgehen.

Einleitung

Das Coronavirus SARS-CoV-2 ist der verursachende Erreger der sich derzeit entwickelnden COVID-19-Pandemie. Innerhalb von weniger als einem Jahr wurden über 60 Millionen Menschen infiziert und die Krankheit hat bereits mehr als 1,4 Millionen Todesfälle verursacht. In Ermangelung eines global abdeckenden Impfprogramms sowie angemessener therapeutischer Möglichkeiten stellt das Virus weiterhin eine große Bedrohung für die öffentliche Gesundheit dar.^[1] Weltweit wird daher daran gearbeitet, Proteine ins Visier zu nehmen, die für die Invasion und Replikation des Virus im eukaryotischen Wirt essenziell sind. In Homologie zu anderen

Coronaviren codiert der erste offene Leserahmen (ORF1ab) des viralen RNA-Genoms viele Proteine, die für die Replikation in der Wirtszelle erforderlich sind, und wird durch einen ribosomalen Frameshifting-Mechanismus abgelesen. Das daraus resultierende Polyprotein wird nach der Expression von der viralen 3C-ähnlichen Protease (3CL^{pro}) und der Papain-ähnlichen Protease (PL^{pro}) prozessiert (Abbildung 1a).^[2] Folglich sind die beiden Proteasen für die Replikation von SARS-CoV-2 essenziell, was sie zu einem der Hauptziele für die Entwicklung eines Wirkstoffs gegen das Virus macht.^[3] Unser Bestreben war es daher, diese Proteasen mit chemischen Sonden gezielt zu untersuchen, um deren Enzymaktivität zu verfolgen und sie zur Entdeckung von Proteaseinhibitoren einsetzen zu können. Aktivitätsbasierte Sonden sind wichtige Werkzeuge sowohl für die Identifizierung von Zielproteinen als auch von Inhibitoren. Darüber hinaus können sie zur Charakterisierung der enzymatischen Reaktivität des aktiven Zentrums in komplexen Proteomen in vitro sowie in lebenden Zellen eingesetzt werden.^[4] Aufgrund ihrer inhärenten Reaktivität gegenüber Elektrophilen haben Proteasen großes Interesse an der Entwicklung und Anwendung chemischer Sonden geweckt.^[5] Wir haben kürzlich über Strategien zum kompetitiven Profiling berichtet, welche die Entwicklung maßgeschneiderter Enzyminhibitoren und das Screening synthetischer Bibliotheken ermöglichen sowie für die Aufreinigung von Naturstoffen eingesetzt werden können.^[6]

Aktivitätsbasierte Sonden beinhalten typischerweise einen elektrophilen Gefechtskopf, um kovalent an einen nukleophilen Rest im aktiven Zentrum eines Enzyms zu binden. Die Spezifität einer Sonde, die einzig auf das aktive Zentrum abzielt, wird durch eine gut abgestimmte Kombination aus der Elektrophilie ihres Gefechtskopfes und einer maßgeschneiderten Molekülstruktur erreicht, die den sterischen und

[*] L. Peñalver, P. Schmid, Dr. D. Szamosvári, Prof. Dr. T. Böttcher
Fachbereich Chemie, Konstanz Research School Chemical Biology
Zukunftskolleg, Universität Konstanz
Konstanz (Deutschland)
Prof. Dr. S. Schildknecht
In Vitro Toxicology and Biomedicine
Fachbereich Biologie, Universität Konstanz
Konstanz (Deutschland)
und
Hochschule Albstadt-Sigmaringen
Sigmaringen (Deutschland)
Dr. C. Globisch, K. Sawade, Prof. Dr. C. Peter
Fachbereich Chemie, Universität Konstanz
Konstanz (Deutschland)

P. Schmid, Prof. Dr. T. Böttcher
Fakultät für Chemie, Institut für Biologische Chemie & Centre for
Microbiology and Environmental Systems Science, Division of
Microbial Ecology, Universität Wien
Wien (Österreich)
E-Mail: Thomas.Boettcher@univie.ac.at

Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummern (OR-
 CIDs) der Autoren sind unter:
<https://doi.org/10.1002/ange.202016113> zu finden.

© 2020 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-
VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedin-
gungen der Creative Commons Attribution License, die jede
Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der
ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

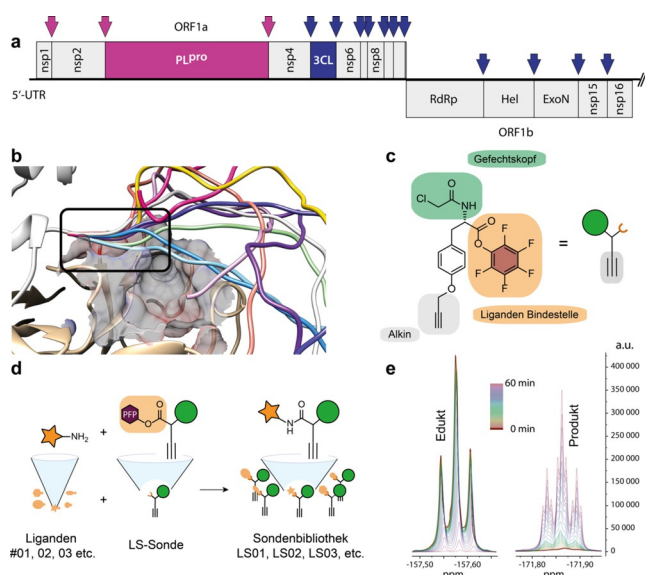


Abbildung 1. SARS-CoV-2-Proteasen und LS-Sondenstrategie. a) Aufbau des SARS-CoV-2-Polyproteins, translatiert aus ORF1ab mit Spaltstellen der Proteasen 3CL^{pro} und PL^{pro}, welche die nichtstrukturellen Proteine (nsp) aus dem Polyprotein herauserschneiden. b) Modellierung des N-Terminus eines 3CL^{pro}-Dimers. c) Molekülstruktur und schematische Darstellung der LS-Sonde mit kovalent bindendem Gefechtskopf, Alkin-Tag und PFP-Ester zur orthogonalen Ligandenmodifikation. d) Schematische Darstellung der parallel durchgeführten Diversifikationsreaktionen der LS-Sonde mit verschiedenen Amin-Liganden. e) Kinetik der Diversifikationsreaktion mit Ligand **09** zur Sonde **LS09**, Verfolgung durch ¹⁹F-NMR in 2-min-Schritten über 60 min.

elektronischen Anforderungen der Substratbindungstaschen entspricht. Da die meisten Elektrophile auch mit Aminosäureresten in der Peripherie eines Enzyms leicht reagieren, besteht die größte Herausforderung bei der Entwicklung chemischer Sonden darin, diese so anzupassen, dass sie ausschließlich an das aktive Zentrum binden. Wir berichten hier über die Entwicklung einer Ligandenselektionsstrategie für aktivitätsbasiertes Protein-Profilings (LS-ABPP), die eine schnelle Entwicklung von spezifisch bindenden chemischen Sonden ermöglicht. Außerdem präsentieren wir in einer Machbarkeitsstudie deren Anwendbarkeit für die Entwicklung von Sonden und die Identifizierung von Inhibitoren für die beiden Proteasen von SARS-CoV-2.

Ergebnisse und Diskussion

Proteaseaktivität. Sowohl 3CL^{pro} als auch PL^{pro} werden aus dem Polyprotein freigesetzt, indem sie ihre jeweiligen N- und C-terminalen Sequenzen selbst spalten, was bereits für die homologen Sequenzen von SARS-CoV-1 beschrieben wurde.^[3a,7]

Hierbei ist die Dimerisierung und Reifung von 3CL^{pro} durch N-terminale Selbstspaltung für die vollständige Aktivierung der Protease und die Fähigkeit zur enzymatischen Umsetzung anderer nichtstruktureller Proteine (nsp) erforderlich.^[8] Aus der Kristallstruktur von reifer, als Dimer vorliegender 3CL^{pro} geht hervor, dass der N-Terminus des einen 3CL^{pro}-Monomers in unmittelbarer Nähe zur Bindeta-

sche des aktiven Zentrums des anderen Monomers liegt und der N-Terminus bereits während der Expression zwischen der kurzen Konsensussequenz Leu-Gln und Ser gespalten wird.^[9] Molekulare Modellierung der flexiblen Peptidsequenz vor der Spaltung hat gezeigt, dass die ersten Aminosäuren vor der Spaltstelle einen Teil der Substratbindungstasche einnehmen (Abbildung 1b), was mit mechanistischen Modellen der Protease-Reifung übereinstimmt.^[8] Die Bedeutung eines gespaltenen N-Terminus für die vollständige enzymatische Aktivität wurde bereits für die 3CL^{pro} von SARS-CoV-1 beschrieben.^[10] Wir schlussfolgerten daraus, dass Inhibitoren, die auf Proteasen vor ihrer vollständigen Aktivierung abzielen, für die Wirkstoffentwicklung gegen SARS-CoV-2 von großem Wert sein könnten. Daher konstruierten wir eine 3CL^{pro}-Version, die mit einem nicht spaltbaren N-terminalen Strep-Tag II (t3CL^{pro}) fusioniert war. Die Modellierung prognostizierte ein identisches Verhalten des Fusionspeptids am aktiven Zentrum im Vergleich zur nativen Sequenz des Wildtyps vor der Spaltung (Hintergrundinformationen Abbildung S1). Codon-optimierte Sequenzen der 3CL^{pro}- und PL^{pro}-Domänen von nsp3 und nsp5 von SARS-CoV-2 wurden schließlich in einen IPTG-induzierbaren Vektor kloniert und heterolog in *Escherichia coli* exprimiert.

Die Proteasen wurden entweder durch Affinitätschromatographie aufgereinigt oder in situ in der nativen Zelle des Expressionssystems verwendet. Die aufgereinigte t3CL^{pro}-Version bestätigte unsere Vorhersagen bezüglich der N-terminalen Modifikation und war in einem Protease-Assay unter Verwendung von Oligopeptidsubstraten, die bei enzymatischer Spaltung eine fluorogene 7-Amino-4-methylcumarin-Gruppe freisetzen, tatsächlich inaktiv (Hintergrundinformationen Abbildung S2). Dies bot die einmalige Gelegenheit, die Nützlichkeit der LS-ABPP-Strategie gegen PL^{pro} und den Präaktivierungszustand 3CL^{pro} von SARS-CoV-2 zu validieren und ihre Vielseitigkeit für die Anpassung von chemischen Sonden an verschiedene Zielproteine zu demonstrieren.

LS-ABPP ermöglicht rasches Screening von aktiven Zentren. Wir haben die LS-ABPP-Strategie entwickelt, um die Molekülstruktur einer Sonde in kurzer Zeit an die Bindetasche des aktiven Zentrums eines betreffenden Enzyms anpassen zu können, und demonstrieren das daraus resultierende Potenzial anhand der Entwicklung spezifischer Sonden gegen t3CL^{pro} und PL^{pro} des pandemischen Coronavirus SARS-CoV-2. Eine chemische LS-Sonde wurde basierend auf der Struktur von Tyrosin synthetisiert. Sie beinhaltet einen Chloracetamid-Rest, der mit dem aktiven Zentrum des Proteins reagiert, sowie ein terminales Alkin, über welches das an die Sonde gebundene Enzym mittels bioorthogonaler Klickreaktion über eine 1,3-dipolare Huisgen-Alkin-Azid-Cycloaddition fluoreszent markiert werden kann (Abbildung 1c). Als zentrales Element des LS-Sondenkonzepts wurde zusätzlich ein Pentafluorphenyl (PFP)-Ester eingeführt, um die schnelle orthogonale Diversifizierung des Molekülgerüsts durch die Reaktion mit einer Bibliothek von primären und sekundären Aminen zu ermöglichen (Abbildung 1d). Die LS-Sonde wurde mit jeweils einem von 27 Amin-Liganden im Mikroliter-Maßstab umgesetzt (Hintergrundinformationen Tabelle S1). Zeitaufgelöste ¹⁹F-NMR-

Spektroskopie zeigte bereits nach 60 min eine vollständige Umsetzung, selbst für die am wenigsten reaktiven aromatischen Amine (Abbildung 1e). Primäre aliphatische Amine reagierten innerhalb von Minuten, was die Nachverfolgung mittels NMR-Spektroskopie unmöglich machte (Hintergrundinformationen Abbildung S3). Obwohl von einer quantitativ ablaufenden Reaktion ausgegangen werden kann, wurden potenzielle Rückstände der nicht umgesetzten Sonde auf Amin-funktionalisiertem Polystyrol-Granulat immobilisiert, um eine unspezifische Markierung der Proteine zu verhindern. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch lyophilisiert, der Rückstand in DMSO gelöst und direkt für Proteinmarkierungsexperimente verwendet.

Ligandenselektion verleiht Spezifität für die Markierung des aktiven Zentrums. Um Sonden mit hoher Spezifität für das aktive Zentrum der Proteasen zu identifizieren, konstruierten wir zusätzlich die entsprechenden inaktiven Mutanten Cys145Ala ($t3CL^{pro}$) und Cys114Ala (PL^{pro}). Anschließend erfolgte ein In-situ-Screening der Sonden in lebenden *E. coli*-Zellen gegen $t3CL^{pro}$ und PL^{pro} sowie gegen die entsprechenden inaktiven Mutanten (Abbildung 2a). Dazu wurden die Zellen eine Stunde lang mit $20 \mu M$ der Liganden-modifizierten Sonden (**LS01–LS29**; Abbildung 2b) inkubiert; nach darauffolgender Lyse der Zellen wurde Tetramethylrhodamin (TAMRA)-Azid als fluoreszenter Reporter-Tag mittels Klickreaktion an die Sonde gebunden. Die Sondenmarkierung der Enzyme konnte nach anschließender SDS-PAGE

durch Fluoreszenzaufnahmen verifiziert werden (Abbildung 2a). Einige der Sonden lieferten stark markierte Banden von $t3CL^{pro}$ und PL^{pro} , während andere in Bezug auf eine oder beide Proteasen inaktiv waren. Sonden, die eine deutliche Markierungsintensität zeigten, wurden weiter auf ihre Spezifität untersucht, indem die Markierung des Wildtyps (wt) und der jeweiligen Mutante des aktiven Zentrums (m) verglichen wurde (Abbildung 2c,d; Hintergrundinformationen Abbildung S4). Die Fluoreszenzintensitäten wurden relativ zur DMSO-Kontrolle quantifiziert, und Sonden mit einem Verhältnis von wt/m > 2 wurden als spezifisch betrachtet. Die meisten Sonden zeigten keine selektive Markierung des aktiven Zentrums oder waren inaktiv, was die Schwierigkeit unterstreicht, eine aktive, spezifische Bindung von Sonden zu erreichen. Jedoch wurden mehrere Sonden identifiziert, die eine hohe Spezifität ausschließlich für die Markierung des Wildtyps, nicht jedoch der Mutanten $t3CL^{pro}$ und PL^{pro} zeigten (Abbildung 2d). Verschiedene Liganden-modifizierte LS-Sonden wiesen außerdem unterschiedliche Bindungsaffinität zu den jeweiligen Enzymen auf. Zum Beispiel zeigten die Sonden **LS18** und **LS20** spezifische Markierung von $t3CL^{pro}$, jedoch nicht von PL^{pro} , während **LS12**, **LS14**, **LS17** und **LS24** spezifisch an PL^{pro} , jedoch nicht an $t3CL^{pro}$ banden. Somit konnten komplementäre Sonden für die beiden Proteasen identifiziert werden. Um ihre Empfindlichkeit abzuschätzen, wurden Markierungsexperimente mit den spezifischsten Sonden in Abhängigkeit von der Konzentration

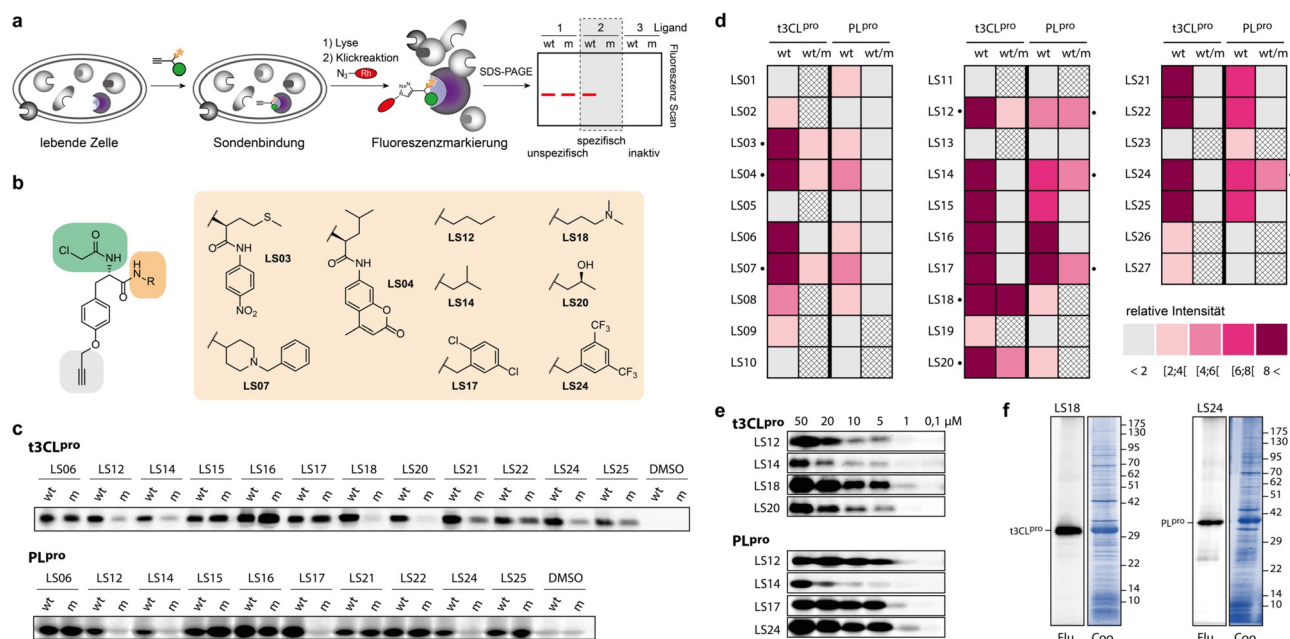


Abbildung 2. Spezifische und selektive Markierung von SARS-CoV-2-Proteasen. a) Markierung der Zielproteine in lebenden *E. coli*-Zellen. $t3CL^{pro}$ und PL^{pro} exprimierende Zellen wurden mit den Sonden behandelt, gefolgt von Zell-Lyse, Klickreaktion mit einem fluoreszenten Reporter-Tag und SDS-PAGE. b) Molekülstrukturen der mit Liganden umgesetzten LS-Sonden mit der höchsten Spezifität. c) Ausschnitt aus dem Screening der Liganden mittels In-situ-Markierung in *E. coli* des Wildtyps (wt) und der Mutante des aktiven Zentrums (m) bei einer Sondenkonzentration von $20 \mu M$ (repräsentative Abbildung aus unabhängigen Triplikaten). d) Quantifizierung der Markierungsintensitäten für die Wildtyp-Proteine (wt), normiert auf DMSO-Kontrollen und Spezifität (wt/m) von LS-Sonden bei $20 \mu M$. Spezifische Sonden zeigen ein hohes Intensitätsverhältnis von Wildtyp zu Mutante ($n = 3$). Kreuzmuster: nicht ermittelt. e) Verdünnungsreihe der spezifischsten Sonden zur Markierung von $t3CL^{pro}$ und PL^{pro} . f) Selektivität der Sonden **LS18** und **LS24** bei $20 \mu M$ zur Markierung der jeweiligen überexprimierten Zielproteasen in situ vor dem Hintergrund eines nativen *E. coli*-Proteoms. Flu: Fluoreszenzaufnahme; Coo: Coomassie-gefärbte Gele. Repräsentative Abbildungen aus unabhängigen Triplikaten.

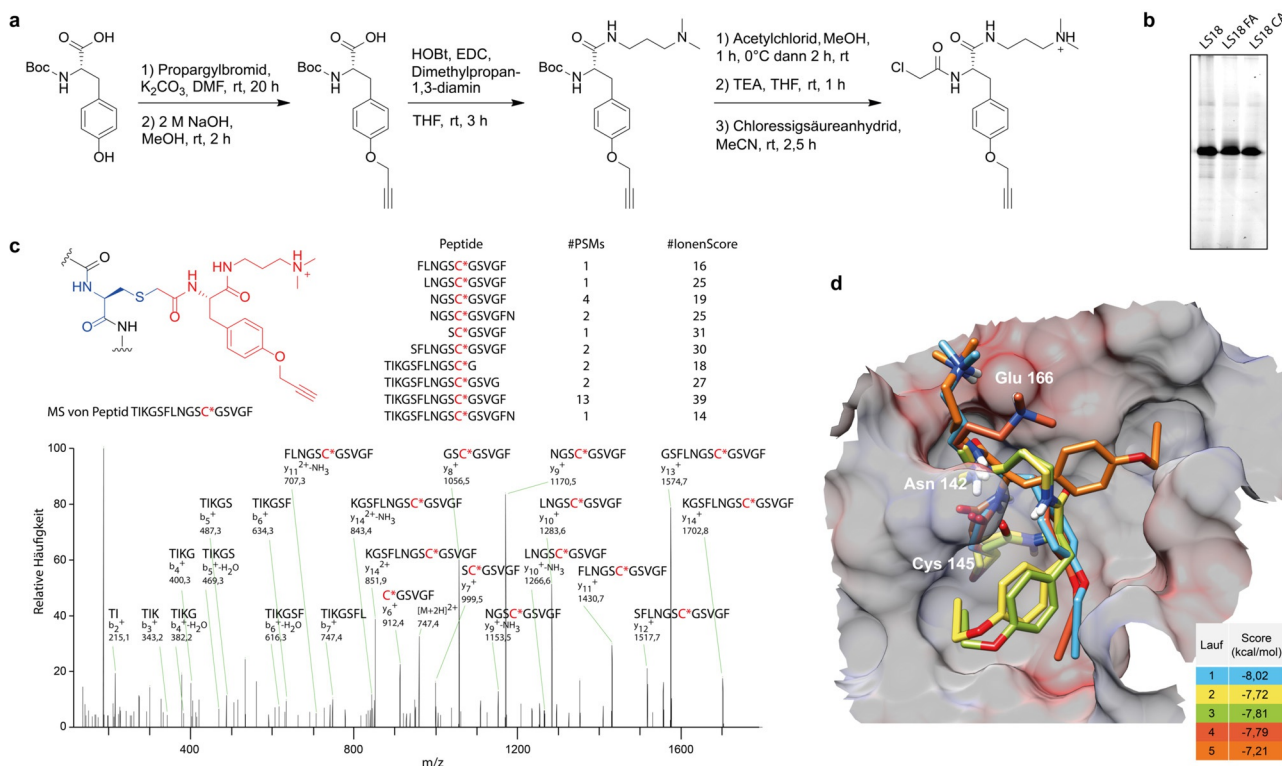


Abbildung 3. Auf das aktive Zentrum ausgerichteter Mechanismus der Sonde **LS18**. a) Präparative Direktsynthese von **LS18** als Chloracetat- (**LS18 CA**) und Formiat-Salze (**LS18 FA**). b) Markierung von $t3CL^{PRO}$ in lebenden Zellen von *E. coli* unter Verwendung von in situ generierter **LS18** im Vergleich zu aufgereinigtem synthetischem **LS18 CA** und **LS18 FA** bei jeweils $20 \mu\text{M}$. c) Proteinsequenzierung von **LS18**-markiertem $t3CL^{PRO}$ durch Massenspektrometrie ergab eine kovalente Modifikation des Cysteins im aktiven Zentrum. Repräsentative Ergebnisse von zwei unabhängigen Replikaten. d) Molekulares Docking von **LS18** an das aktive Zentrum der Kristallstruktur von $3CL^{PRO}$ (PDB-ID: 6YB7). Ein Video mit den am besten bewerteten Docking-Posen von **LS18** finden Sie in den Hintergrundinformationen.

on durchgeführt. Bemerkenswerterweise wurden $t3CL^{PRO}$ von **LS18** und PL^{PRO} von **LS17** und **LS24** als empfindlichste Sonden bei Konzentrationen von nur $1 \mu\text{M}$ markiert (Abbildung 2e). Außerdem waren die überexprimierten $t3CL^{PRO}$ und PL^{PRO} die einzigen Proteine, die von den Sonden **LS18** und **LS24** in lebenden *E.-coli*-Zellen markiert wurden, was deren Selektivität vor dem Hintergrund eines nativen Proteoms unterstreicht (Abbildung 2f).

LS18 bindet kovalent an das Cystein im aktiven Zentrum von $t3CL^{PRO}$. Zur beispielhaften Validierung der Identität und Aktivität der Liganden-modifizierten LS-Sonden wurde ein präparativer Syntheseweg zur Sonde **LS18** entwickelt (Abbildung 3a). Ausgehend von Boc-geschütztem L-Tyrosin wurde das terminale Alkin durch Veretherung mit Propargylbromid eingeführt und anschließend über Amidkupplung mittels *N,N*-Dimethylpropan-1,3-diamin mit dem Amin-Ligand verknüpft. Zuletzt wurde der Chloracetamid-Gefechtskopf eingebracht, wobei **LS18** als Chloracetat- beziehungsweise Formiat-Salz erhalten wurde.

Im Vergleich zu in situ durch LS-Sonden-Diversifikation generierter **LS18** zeigten beide synthetischen Versionen der Sonde identische Aktivität und Selektivität im nativen *E.-coli*-Proteom (Abbildung 3b). Um die Wirkungsweise im aktiven Zentrum zu bestätigen und die Stelle der kovalenten Modifikation zu identifizieren, wurde $t3CL^{PRO}$ in lebenden *E.-coli*-Zellen mit Sonde **LS18** markiert, gefolgt von Zellyse und

SDS-PAGE ohne vorherige Klickreaktion. Die Coomassiegefärbte Bande von $t3CL^{PRO}$ wurde aus dem Gel ausgeschnitten, mit Pepsin verdaut und mittels Massenspektrometrie sequenziert. Die Überprüfung auf Modifikationen der einzelnen Aminosäuren durch **LS18** bestätigte die kovalente Bindung der Sonde an das aktive Zentrum (Abbildung 3c). Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde ein kovalentes molekulares Docking von **LS18** an das aktive Zentrum der Kristallstruktur von $t3CL^{PRO}$ von SARS-CoV-2 (PDB-ID: 6YB7) durchgeführt.^[9a] Obwohl die fünf am besten bewerteten Docking-Ergebnisse eine gewisse Streuung aufweisen, fiel die allgemeine Orientierung der Sonde in allen Fällen ähnlich aus (Abbildung 3d). Das molekulare Docken von **LS18** ergab vergleichbare Ergebnisse, sowohl für die native Form von $3CL^{PRO}$ mit verkürztem N-Terminus als auch mit unseren Strukturmodellen des verlängerten nativen N-Terminus vor der Selbstspaltung von $3CL^{PRO}$ und dem nicht spaltbaren Strep-Tag-II-modifizierten N-Terminus (Hintergrundinformationen Abbildung S5). Um einen Einfluss des N-terminalen Strep-Tags II auf die Bindung der Sonde auszuschließen, wurde der Tag über eine Enterokinase-Schnittstelle entfernt, woraus eine $3CL^{PRO}$ -Version resultierte, die im Vergleich zur nativen Form einen lediglich um zwei Aminosäuren verlängerten N-Terminus aufwies. Die erfolgreiche Markierung dieser verkürzten Variante von $t3CL^{PRO}$ mit der Sonde **LS18** bestätigte, dass dank deren geringer Molekülgröße eine

Markierung des aktiven Zentrums der Protease unabhängig von ihrer Aktivierungsstufe möglich ist (Hintergrundinformationen Abbildung S6).

Vergleich von 3CL^{pro}-Homologen. Um zu untersuchen, ob unsere LS-Sondenstrategie auch die Markierung von 3CL^{pro} des eng verwandten SARS-CoV-1, das ebenfalls der Untergattung *Sarbecovirus* angehört, ermöglicht, wurden auch dessen Wildtyp- und Mutantensequenzen exprimiert und LS-Sondenmarkierungsexperimente in situ durchgeführt. Für die meisten Liganden-modifizierten LS-Sonden waren die Markierungsintensität und -spezifität für das aktive Zentrum beider t3CL^{pro}-Homologe praktisch identisch (Hintergrundinformationen Abbildung S7a), was eine Robustheit der Methode auch über verschiedene Virusstämme hinweg zeigt.

Die Sonden **LS06** und **LS17** zeigten jedoch eine konzentrationsabhängige Spezifität für t3CL^{pro} von SARS-CoV-1, während sie für SARS-CoV-2 unspezifisch waren (Hintergrundinformationen Abbildung S7b–d). Diese geringfügigen, aber wichtigen Unterschiede verdeutlichen die Anwendbarkeit der LS-Sondenstrategie zur Feinabstimmung chemischer Sonden auf die jeweiligen Eigenschaften des aktiven Zentrums des entsprechenden Enzyms.

Kompetitives Screening identifiziert Enzyminhibitoren.

Da unsere Sonden eine empfindliche und für das aktive Zentrum spezifische Markierung von PL^{pro} sowie des Präaktivierungszustands von 3CL^{pro} zeigten, wollten wir ihr Potenzial als chemische Hilfsmittel für das kompetitive Screening von Enzyminhibitoren nutzen. Die Molekülstrukturen von mehr als 1000 kommerziell erhältlichen Lebensmittelzusatzstoffen, Naturstoffen und Proteaseinhibitoren wurden durchsucht, von denen die meisten für eine menschliche Anwendung zugelassen sind. Daraus wurden manuell 44 Verbindungen mit elektrophilen Strukturmotiven wie Aldehyden, Michael-Akzeptoren, Epoxiden und Estern ausgewählt, die potenziell mit dem nukleophilen Cystein des aktiven Zentrums von 3CL^{pro} und PL^{pro} kovalent reagieren könnten, und in Form von DMSO-Stocks in einer Bibliothek zusammengestellt (Hintergrundinformationen Tabelle S2). In einem vorläufigen Screening wurden die aufgereinigten Proteasen mit den einzelnen elektrophilen Verbindungen vorinkubiert und anschließend mit den Sonden markiert (**LS18** für t3CL^{pro} und **LS24** für PL^{pro}). Wirksame Inhibitoren würden das aktive Zentrum blockieren und dadurch eine nachfolgende Sondenmarkierung verhindern, was als verringerte Fluoreszenzintensität in der SDS-PAGE ausgelesen werden könnte (Abbildung 4a). Bei einer Anfangskonzentration von 200 μM wurde die Sondenmarkierung von einigen Verbindungen vollständig unterbunden (Abbildung 4b, Hintergrundinformationen Abbildung S8). Durch anschließende Quantifizierung des Fluoreszenzsignals relativ zur Kontrolle wurden die Verbindungen ausgewählt, die zu einer mindestens 50-prozentigen Hemmung der kompetitiven Sondenmarkierung führten, um ihre Dosis-Wirkungs-Beziehung zu untersuchen (Abbildung 4c). Die jeweilige mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) wurde aus Kurvenanpassungen der Quantifizierung der konzentrationsabhängigen kompetitiven Markierung berechnet (Abbildung 4d).

Phenethylisothiocyanat, das von Pflanzen aus der Brassicaceae-Familie aus seinem Vorläufer Gluconasturtiin synthe-

tisiert wird,^[11] wurde als Inhibitor beider Proteasen identifiziert, was wahrscheinlich auf die unspezifische Thiol-Reaktivität von Isothiocyanaten zurückzuführen ist; jedoch konnte nur eine unvollständige Hemmung festgestellt werden (**X05**, Hintergrundinformationen Abbildung S9a,b). Hingegen inhibierte Curcumin (**M03**) die Markierung von PL^{pro} mit einem IC_{50} von 26 μM fast vollständig und war gegen t3CL^{pro} inaktiv (Hintergrundinformationen Abbildung S9b). Curcumin ist jedoch eine bekannte Pan-Assay-Interferenz-Verbindung (PAIN) und als solche von keinem besonderen Interesse.^[12] Sowohl **X05** als auch **M03** hemmten die enzymatische Spaltung eines fluorogenen Peptidsubstrats durch PL^{pro}, was die Validität des kompetitiven Screening-Ansatzes bestätigte (Hintergrundinformationen Abbildung S10). Interessanter war die Aktivität von Salvianolsäure B (**M26**, **SalB**), welche die Markierung von t3CL^{pro} mit einem IC_{50} von 12 μM inhibierte (Abbildung 4d–f). Wir konzentrierten uns daher auf ähnliche Verbindungen mit entsprechendem Kaffeesäureester-Strukturmotiv. Alle Verbindungen zeigten eine klare Dosis-Wirkungs-Beziehung, wobei Rosmarinsäure (**Ros**) und Salvianolsäure A (**SalA**) mit IC_{50} -Werten von 10 bzw. 4,8 μM die höchste inhibitorische Wirkung aufwiesen. Interessanterweise war Salvianolsäure C (**SalC**), die sich von **SalA** nur durch eine an einen Benzofuranring gebundene Hydroxygruppe unterscheidet, mit einem IC_{50} von 91 μM erheblich weniger aktiv (Abbildung 4e–g). Auch die eng verwandte Lithospermsäure (**Lith**) ergab lediglich einen IC_{50} von 32 μM . Diese Ergebnisse zeigen eine fein abgestimmte Struktur-Aktivitäts-Beziehung von Salvianolsäurederivaten für die Inhibition von t3CL^{pro}. Um ein besseres Verständnis der molekularen Abläufe der Proteasehemmung zu erhalten, wurde ein molekulares Docking von **SalA** an das aktive Zentrum von t3CL^{pro} durchgeführt (Abbildung 4h). Die besten Docking-Ergebnisse zeigten alle nahezu identische Orientierungen im aktiven Zentrum mit mehreren Wasserstoffbrückenbindungen über die Kresolreste und lieferten erheblich höhere Docking-Werte im Vergleich zu der **LS18**-Sonde. **SalA** füllte den größten Teil der Bindungstasche des aktiven Zentrums, und das Docking wurde durch die N-terminale Modifikation nicht behindert, was nahelegt, dass die kompetitive Markierung mit individuell angepassten LS-Sonden die Entdeckung von Inhibitoren ermöglicht, die 3CL^{pro} bereits in der Präaktivierungsphase blockieren können. Da **SalA** sowie andere potente Salvianolsäurederivate von chinesischem Rotwurzelsalbei (*Salvia miltiorrhiza*) biosynthetisch hergestellt werden, wurden getrocknete Wurzeln von *S. miltiorrhiza* extrahiert und in einem kompetitiven Markierungsassay mit der Sonde **LS18** gegen t3CL^{pro} getestet, wobei eine starke Hemmung bis zu einer Konzentration von 1 mg mL^{-1} Extrakt beobachtet wurde (Abbildung 4i). Um den Einfluss des N-Terminus der Präaktivierungsstufe von 3CL^{pro} auf die Sonden- und Inhibitorenbindung zu untersuchen, führten wir zusätzliche Experimente mit nativer 3CL^{pro} (n3CL^{pro}) durch, die einen gespaltenen N- und C-Terminus aufweist. Die Sonde **LS18** markierte n3CL^{pro} mit ausgezeichneter Sensitivität bei Sondenkonzentrationen bis zu 0,2 μM (Abbildung 4j). Im Gegensatz zu t3CL^{pro} zeigte die vollständig gereifte n3CL^{pro} Aktivität bei der enzymatischen Spaltung fluorogener Substrate (Hintergrundinformationen Abbil-

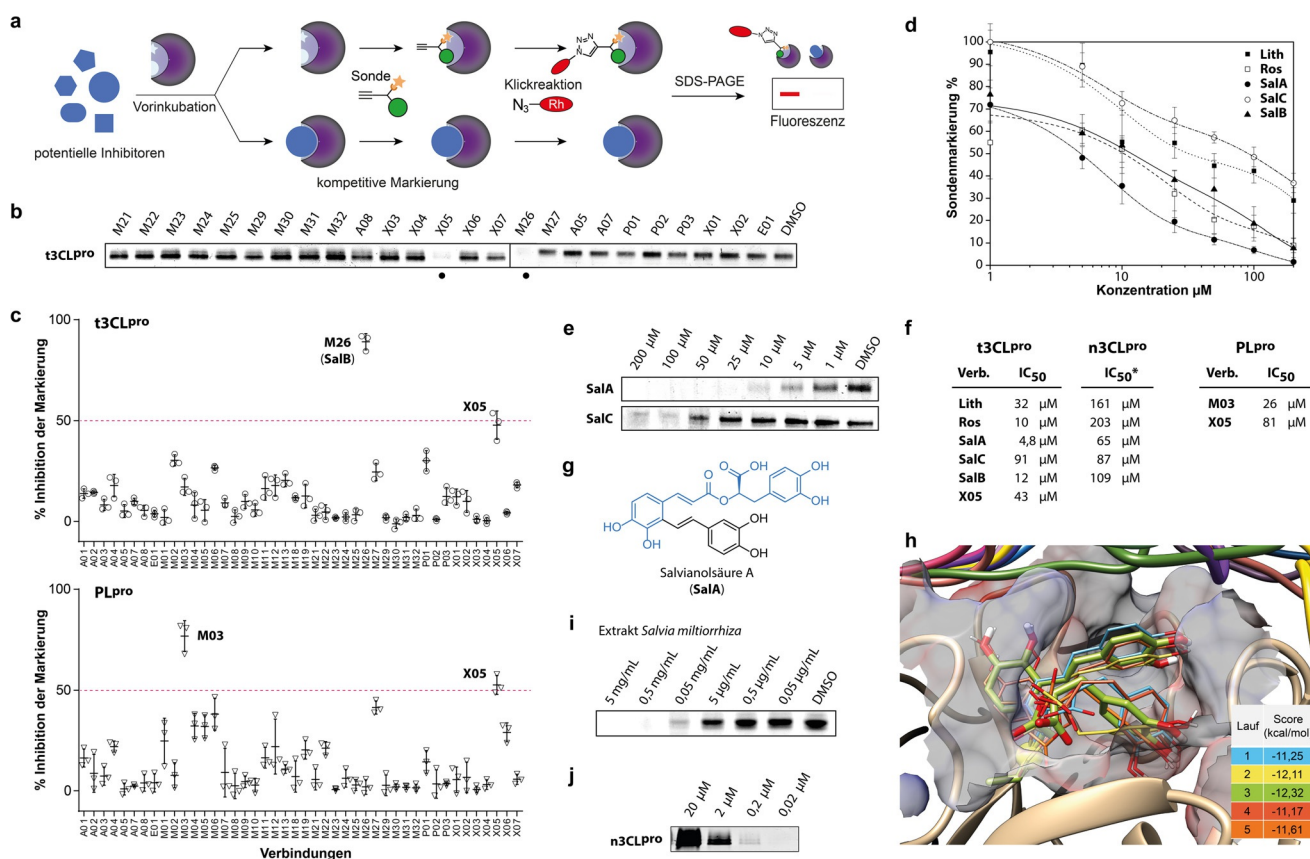


Abbildung 4. Anwendung chemischer Sonden zur Markierung der Proteasen und zum kompetitiven Profiling. a) Kompetitive Profiling-Strategie, bei der die Proteasen mit potenziellen Inhibitoren vorinkubiert werden, gefolgt von einer kompetitiven Markierung mit einer spezifischen Sonde. Die Fluoreszenz in der SDS-PAGE wird bei erfolgreicher Inhibition des aktiven Zentrums aufgehoben oder verringert. b) Beispiel einer kompetitiven Markierung von 3CL^{pro} mit Verbindungen der zusammengestellten Bibliothek bei einer Konzentration von 200 und 5 µM der Sonde **LS18**. c) Ergebnisse des vorläufigen kompetitiven Screenings der elektrophilen Verbindungen der Bibliothek bei 200 µM gegen 3CL^{pro} (**LS18**) und PL^{pro} (**LS24**) ($n=3$). d) Inhibitionskurven von 3CL^{pro}-Inhibitoren, bestimmt durch Quantifizierung der Fluoreszenzmarkierungsintensität durch **LS18** ($n=3$). **Lith**: Lithospermsäure; **Ros**: Rosmarinsäure; **SalA**: Salvianolsäure A; **SalC**: Salvianolsäure C; **SalB**: Salvianolsäure B. e) Beispiele für konzentrationsabhängige Fluoreszenzintensität im SDS-PAGE mit kompetitiver Fluoreszenzmarkierung von 3CL^{pro}. f) IC₅₀-Werte der aktivsten Inhibitoren, quantifiziert durch kompetitive Fluoreszenzmarkierung. g) Molekülstruktur von Salvianolsäure A (**SalA**) mit dem für Salvianolsäurederivate typischen Strukturmotiv in Blau. h) Kovalentes Docking von **SalA** an das aktive Zentrum von t3CL^{pro} (PDB-ID: 6YB7). i) Kompetitive Sondenmarkierung mit Verdünnungsreihen von Wurzelextrakten aus *Salvia miltiorrhiza*. j) Markierung von reifer n3CL^{pro} (0,2 mg mL⁻¹) durch **LS18** in Abhängigkeit von der Sondenkonzentration.

dung S11). Daraufhin wurden mittels der Substratspaltungssassays die IC₅₀-Werte für die Inhibitoren bestimmt, die für die Präaktivierungsstufe von 3CL^{pro} identifiziert wurden. Alle Salvianolsäurederivate hemmten die enzymatische Aktivität von n3CL^{pro} vollständig, wenn auch bei vergleichsweise hohen Konzentrationen (Abbildung 4 f, Hintergrundinformationen Abbildung S12). Zum Beispiel ergab **SalA** einen IC₅₀ von 65 µM für die Hemmung von n3CL^{pro}. Umgekehrt reduzierte GC376,^[13] ein bekannter nanomolarer Inhibitor von reifer n3CL^{pro}, die kompetitive Markierung von t3CL^{pro} vergleichsweise schwach (Hintergrundinformationen Abbildung S13).

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass Inhibitoren der Präaktivierungsstufe von 3CL^{pro} etwas andere strukturelle Anforderungen umfassen als Inhibitoren von reifer 3CL^{pro} und in Standard-Screening-Assays möglicherweise nicht erfasst werden.

Protease-Markierung im menschlichen Proteom. Als nächstes wollten wir als mögliche Anwendung der Sonden

die Markierung die Proteasen im Hintergrund eines nativen menschlichen Proteoms untersuchen. Wir verwendeten Lysate von menschlichen Hepatozellulären Karzinomzellen (HepG2) und versetzten diese mit verschiedenen Konzentrationen von aufgereinigter t3CL^{pro} und PL^{pro}. Mithilfe der Sonden **LS18** für t3CL^{pro} und **LS24** für PL^{pro} bei 20 µM und anschließender Klickreaktion konnten beide Proteasen als starke Banden bei Proteasekonzentrationen bis zu 77 µg mL⁻¹ nachgewiesen werden (Hintergrundinformationen Abbildung S14). Schließlich verglichen wir die Markierung von t3CL^{pro} und n3CL^{pro}, wofür absteigende Konzentrationen der Proteasen zum Proteom menschlicher Alveolarepithelzellen (A549), die bereits in Infektionsmodellen für SARS-CoV-2 Einsatz fanden, zugegeben wurden.^[14] Während t3CL^{pro} mit der Sonde **LS18** mit vergleichbarer Empfindlichkeit wie im HepG2-Proteom markiert wurde (Abbildung 5 a), konnte n3CL^{pro} sogar bei Konzentrationen von 1 µg mL⁻¹ nachge-

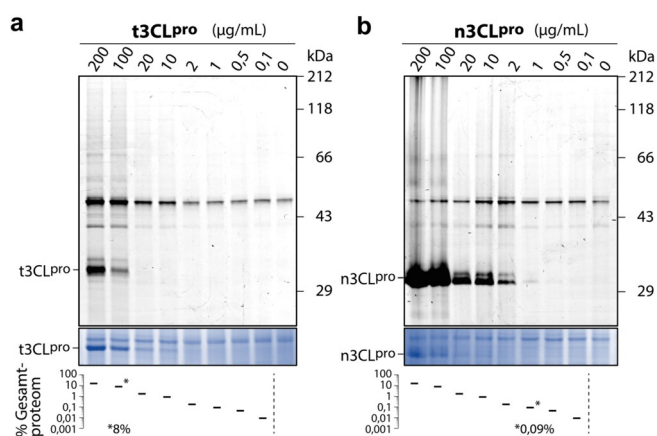


Abbildung 5. Nachweis von 3CL^{pro} vor dem Hintergrund eines nativen Proteoms (1,14 mg mL⁻¹) von menschlichen A549-Alveolarepithelzellslysaten. a) Markierung von t3CL^{pro} und b) n3CL^{pro} durch die Sonde **LS18** bei 20 µM Sondenkonzentration. Die Prozentsätze an zugesetzter 3CL^{pro} sind in Bezug auf die Gesamteinkonzentration angegeben. Der Absolutwert ist für die entsprechende Nachweisgrenze angegeben.

wiesen werden, wobei der Anteil von n3CL^{pro} im nativen Proteom nur 0,09 % betrug (Abbildung 5 b).

In eukaryotischen Zellslysaten wurden nur relativ wenige zusätzliche Off-Target-Banden markiert, was darauf hindeutet, dass die beschriebenen Sonden zusätzlich verwendet werden könnten, um SARS-CoV-2-Proteasen vor dem Hintergrund eines komplexen Proteoms zu markieren und ihre Aktivität nachzuweisen. Die Proteasen von SARS-CoV-2 stehen derzeit im Fokus der Forschung zur Wirkstoffentwicklung gegen COVID-19.^[9b,15] Obwohl aktivitätsbasierte Sonden wichtige chemische Werkzeuge für die Grundlagenforschung und die Wirkstoffentdeckung darstellen, wurde diesbezüglich bisher überraschend wenig Arbeit an Corona-Viren geleistet. Lediglich eine Sonde auf Peptidsubstratbasis wurde kürzlich für 3CL^{pro} beschrieben.^[16]

Wir haben eine Ligandenselektionsstrategie entwickelt, mit der chemische Sonden in kurzer Zeit auf die spezifische Markierung des aktiven Zentrums eines zu untersuchenden Enzyms zugeschnitten werden können, und ihre Vielseitigkeit bei der Entwicklung aktivitätsbasierter Sonden gegen die Coronavirus-Proteasen 3CL^{pro} und PL^{pro} demonstriert. Während alle Sonden einen identischen elektrophilen Chloroacetamid-Gefechtskopf aufwiesen, zeigten nur wenige von ihnen eine hohe Spezifität bei der Markierung des nukleophilen Cysteins im aktiven Zentrum der Enzyme. Diese Ergebnisse zeigen, dass die gewünschte Spezifität von der Auswahl des richtigen Liganden abhängt, und legen nahe, dass ein umfassendes Ligandenscreening der Schlüssel zur Entwicklung optimierter chemischer Sonden ist. Unser Ansatz zur Ligandenselektion ermöglicht ein schnelles Screening der strukturellen Diversität an der Ligandenstelle, ohne dass die zeitaufwändige Synthese größerer Sondenbibliotheken erforderlich ist. Aktivitätsbasierte Sonden sind außerdem nützlich, um Enzyme funktionell zu charakterisieren, und für das Profiling ihrer Aktivität in komplexen Proteomen.^[17] Wir gehen davon aus, dass unsere 3CL^{pro}- und PL^{pro}-spezifischen Sonden bedeutende Werkzeuge zur weiteren Untersuchung der Aktivi-

tätsfunktion dieser wichtigen Coronavirus-Proteasen darstellen werden. Die Sonden könnten von besonderem Interesse sein, um die Aktivierung von 3CL^{pro} durch Selbstspaltung oder die Deubiquitinierungsaktivität (DUB) von PL^{pro} zu untersuchen, welche die Proteostase der Wirtszelle während des Infektionsprozesses moduliert.^[18] Darüber hinaus haben wir gezeigt, dass unsere chemischen Sonden nützliche Werkzeuge für die Entdeckung von Inhibitoren gegen 3CL^{pro} und PL^{pro} durch kompetitives Profiling sind. Eine große Menge Arbeit wurde bereits aufgewendet, um Inhibitoren des reifen Stadiums von 3CL^{pro} mithilfe virtueller^[19] und substratbasierter Screening-Ansätze^[9b,15b,20] sowie rationaler design- und strukturgesteuerter Optimierungsansätze zu finden.^[15a,21] Diese jüngsten Entwicklungen profitierten von einer Vielzahl vorangehender Arbeiten zu 3CL^{pro}-Inhibitoren von SARS-CoV-1.^[3a,22] Unsere 3CL^{pro}-spezifischen Sonden bieten die einzigartige Gelegenheit, diese Protease vor der N-terminalen Selbstspaltung zu untersuchen und Inhibitoren einer Präaktivierungsstufe des Enzyms zu entdecken, die mit herkömmlichen Substratspaltungsassays nicht erfasst werden können. Wir haben Salviaolsäurederivate als wirksame Inhibitoren von 3CL^{pro} identifiziert, darunter Salviaolsäure A, welche die Sondenmarkierung bei einstelligen mikromolaren Konzentrationen wirksam blockiert. Auch Wurzel-extrakte von *Salvia miltiorrhiza* (chinesischer Rotwurzelsalbei), in dem Salviaolsäuren natürlicherweise vorkommen, zeigten eine starke inhibitorische Wirkung. Extrakte von *S. miltiorrhiza* und **SalA** haben bekanntermaßen antithrombotische Wirkungen,^[23] und Salviaolat-Injektionen (hauptsächlich **SalB**) sind in China klinisch zugelassen und werden häufig zur Behandlung von koronaren Herzerkrankungen eingesetzt.^[24] Da Herz-Kreislauf-Erkrankungen einer der größten Risikofaktoren für die von COVID-19 hervorgerufene Morbidität und Mortalität darstellen,^[25] wären Herz-Kreislauf-Medikamente mit zusätzlicher Aktivität als Corona-Virus-Protease-Inhibitoren von großem Interesse. Unsere Ergebnisse sind daher von unmittelbarer Relevanz für die Forschung an SARS-CoV-2 und die Entwicklung von Wirkstoffen, und unsere neuartige Strategie zur Ligandenselektion ist von allgemeiner Bedeutung für die Entwicklung von Werkzeugen für die Enzymologie und die chemische Proteomik.

Schlussfolgerung

Wir berichten die Entwicklung einer äußerst anpassungsfähigen Strategie zur Ligandenselektion, mit der sich chemische Sonden schnell anpassen lassen, um die Spezifität für das aktive Zentrum einer zu untersuchenden Protease zu erreichen. Als Machbarkeitsstudie untersuchten wir die beiden Cysteinproteasen des Coronavirus SARS-CoV-2, um zu zeigen, dass Selektivität und Effektivität tatsächlich über die Ligandenstruktur gesteuert und feinabgestimmt werden können. Wir konnten Sonden mit einstelliger mikromolarer Aktivität für die Coronavirus-Proteasen 3CL^{pro} und PL^{pro} entwickeln und deren Wert als chemische Werkzeuge für die Markierung der aktiven Zentren dieser Enzyme in komplexen Proteomen sowie für das Screening von Inhibito-

ren zur Entwicklung eines Wirkstoffs gegen COVID-19 demonstrieren.

Danksagung

Diese Forschungsarbeit wurde vom Emmy Noether-Programm (DFG), dem SFB969 und dem EU-RP7 Marie Curie ZIF finanziert. Wir danken Prof. Dr. Andreas Marx und seiner Gruppe für die großzügige Unterstützung. Wir möchten uns auch bei der Proteomics Core Facility der Universität Konstanz für die Unterstützung bei der Proteomanalyse bedanken. Besonderer Dank gilt der Notfallkinderbetreuung an der Universität Konstanz. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Stichwörter: ABPP · Chemische Sonden · Enzyminhibitoren · Markierung · Proteasen

- [1] C. Huang, Y. Wang, X. Li, L. Ren, J. Zhao, Y. Hu, L. Zhang, G. Fan, J. Xu, X. Gu, Z. Cheng, T. Yu, J. Xia, Y. Wei, W. Wu, X. Xie, W. Yin, H. Li, M. Liu, Y. Xiao, H. Gao, L. Guo, J. Xie, G. Wang, R. Jiang, Z. Gao, Q. Jin, J. Wang, B. Cao, *Lancet* **2020**, 395, 497–506.
- [2] J. F. Chan, K. H. Kok, Z. Zhu, H. Chu, K. K. To, S. Yuan, K. Y. Yuen, *Emerging Microbes Infect.* **2020**, 9, 221–236.
- [3] a) R. Hilgenfeld, *FEBS J.* **2014**, 281, 4085–4096; b) S. Ullrich, C. Nitsche, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, 30, 127377.
- [4] a) B. F. Cravatt, A. T. Wright, J. W. Kozarich, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, 77, 383–414; b) M. H. Wright, S. A. Sieber, *Nat. Prod. Rep.* **2016**, 33, 681–708; c) T. Böttcher, M. Pitscheider, S. A. Sieber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 2680–2698; *Angew. Chem.* **2010**, 122, 2740–2759; d) M. J. Niphakis, B. F. Cravatt, *Annu. Rev. Biochem.* **2014**, 83, 341–377.
- [5] M. Fonović, M. Bogoy, *Expert Rev. Proteomics* **2008**, 5, 721–730.
- [6] a) A. Pawar, M. Basler, H. Goebel, G. O. Alvarez Salinas, M. Groettrup, T. Böttcher, *ACS Cent. Sci.* **2020**, 6, 241–246; b) M. Prothiwa, F. Englmaier, T. Böttcher, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140, 14019–14023.
- [7] B. H. Harcourt, D. Jukneliene, A. Kanjanahaluethai, J. Bechill, K. M. Severson, C. M. Smith, P. A. Rota, S. C. Baker, *J. Virol.* **2004**, 78, 13600–13612.
- [8] S. Chen, F. Jonas, C. Shen, R. Hilgenfeld, *Protein Cell* **2010**, 1, 59–74.
- [9] a) L. Zhang, D. Lin, X. Sun, U. Curth, C. Drosten, L. Sauerhering, S. Becker, K. Rox, R. Hilgenfeld, *Science* **2020**, 368, 409–412; b) Z. Jin, X. Du, Y. Xu, Y. Deng, M. Liu, Y. Zhao, B. Zhang, X. Li, L. Zhang, C. Peng, Y. Duan, J. Yu, L. Wang, K. Yang, F. Liu, R. Jiang, X. Yang, T. You, X. Liu, X. Yang, F. Bai, H. Liu, X. Liu, L. W. Guddat, W. Xu, G. Xiao, C. Qin, Z. Shi, H. Jiang, Z. Rao, H. Yang, *Nature* **2020**, 582, 289–293.
- [10] X. Y. Xue, H. T. Yang, W. Shen, Q. Zhao, J. Li, K. L. Yang, C. Chen, Y. H. Jin, M. Bartlam, Z. H. Rao, *J. Mol. Biol.* **2007**, 366, 965–975.
- [11] C. Sturm, A. E. Wagner, *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, 1890.
- [12] J. Baell, M. A. Walters, *Nature* **2014**, 513, 481–483.
- [13] L. Fu, F. Ye, Y. Feng, F. Yu, Q. Wang, Y. Wu, C. Zhao, H. Sun, B. Huang, P. Niu, H. Song, Y. Shi, X. Li, W. Tan, J. Qi, G. F. Gao, *Nat. Commun.* **2020**, 11, 4417.
- [14] M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder, N. Kruger, T. Herrler, S. Erichsen, T. S. Schiergens, G. Herrler, N. H. Wu, A. Nitsche, M. A. Muller, C. Drosten, S. Pohlmann, *Cell* **2020**, 181, 271–280.
- [15] a) W. Dai, B. Zhang, X. M. Jiang, H. Su, J. Li, Y. Zhao, X. Xie, Z. Jin, J. Peng, F. Liu, C. Li, Y. Li, F. Bai, H. Wang, X. Cheng, X. Cen, S. Hu, X. Yang, J. Wang, X. Liu, G. Xiao, H. Jiang, Z. Rao, L. K. Zhang, Y. Xu, H. Yang, H. Liu, *Science* **2020**, 368, 1331–1335; b) C. Ma, M. D. Sacco, B. Hurst, J. A. Townsend, Y. Hu, T. Szeto, X. Zhang, B. Tarbet, M. T. Marty, Y. Chen, J. Wang, *Cell Res.* **2020**, 30, 678–692; c) T. Pillaiyar, S. Meenakshisundaram, M. Manickam, *Drug Discovery Today* **2020**, 25, 668–688; d) B. T. Freitas, I. A. Durie, J. Murray, J. E. Longo, H. C. Miller, D. Crich, R. J. Hogan, R. A. Tripp, S. D. Pegan, *ACS Infect. Dis.* **2020**, 6, 2099–2109.
- [16] M. A. T. van de Plassche, M. Barniol-Xicota, S. Verhelst, *Chem-BioChem* **2020**, 21, 3383–3388.
- [17] a) K. T. Barglow, B. F. Cravatt, *Nat. Methods* **2007**, 4, 822–827; b) L. I. Willems, H. S. Overkleeft, S. I. van Kasteren, *Bioconjugate Chem.* **2014**, 25, 1181–1191.
- [18] a) H. A. Lindner, N. Fotouhi-Ardakani, V. Lytvyn, P. Lachance, T. Sulea, R. Menard, *J. Virol.* **2005**, 79, 15199–15208; b) V. Clemente, P. D'Arcy, M. Bazzaro, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 3492; c) D. Niemeyer, K. Mosbauer, E. M. Klein, A. Sieberg, R. C. Mettelman, A. M. Mielech, R. Dijkman, S. C. Baker, C. Drosten, M. A. Muller, *PLoS Pathog.* **2018**, 14, e1007296.
- [19] a) Y. W. Chen, C. B. Yiu, K. Y. Wong, *F1000Res.* **2020**, 9, 129; b) A. T. Ton, F. Gentile, M. Hsing, F. Ban, A. Cherkasov, *Mol. Inf.* **2020**, 39, 2000028.
- [20] W. Zhu, M. Xu, C. Z. Chen, H. Guo, M. Shen, X. Hu, P. Shinn, C. Klumpp-Thomas, S. G. Michael, W. Zheng, *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2020**, 3, 1008–1016.
- [21] A. D. Rathnayake, J. Zheng, Y. Kim, K. D. Perera, S. Mackin, D. K. Meyerholz, M. M. Kashipathy, K. P. Battaile, S. Lovell, S. Perlman, W. C. Groutas, K. O. Chang, *Sci. Transl. Med.* **2020**, 12, eabc5332.
- [22] a) J. Jacobs, S. Zhou, E. Dawson, J. S. Daniels, P. Hodder, V. Tokars, A. Mesecar, C. W. Lindsley, S. R. Stauffer, *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program, National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD)*, **2010**; b) J. E. Blanchard, N. H. Elowe, C. Huitema, P. D. Fortin, J. D. Cechetto, L. D. Eltis, E. D. Brown, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 1445–1453; c) J. Jacobs, V. Grum-Tokars, Y. Zhou, M. Turlington, S. A. Saldanha, P. Chase, A. Egger, E. S. Dawson, Y. M. Baez-Santos, S. Tomar, A. M. Mielech, S. C. Baker, C. W. Lindsley, P. Hodder, A. Mesecar, S. R. Stauffer, *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 534–546; d) T. Pillaiyar, M. Manickam, V. Namasivayam, Y. Hayashi, S. H. Jung, *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 6595–6628.
- [23] Z. M. Li, S. W. Xu, P. Q. Liu, *Acta Pharmacol. Sin.* **2018**, 39, 802–824.
- [24] G. X. Zhang, Y. Y. Zhang, X. X. Zhang, P. Q. Wang, J. Liu, Q. Liu, Z. Wang, *Acta Pharmacol. Sin.* **2018**, 39, 952–960.
- [25] A. Paramasivam, J. V. Priyadharsini, S. Raghunandhakumar, P. Elumalai, *Hypertens. Res.* **2020**, 43, 729–730.

Manuskript erhalten: 3. Dezember 2020

Akzeptierte Fassung online: 21. Dezember 2020

Endgültige Fassung online: 28. Januar 2021