

Diss. ETH Nr. 12037

***De novo*-Design und Synthese neuartiger, nichtpeptidischer
Thrombin-Inhibitoren**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels
Doktorin der Naturwissenschaften
der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von

Ulrike Obst

Dipl.-Chem., Universität Leipzig
geboren am 14. August 1969
Bürgerin der Bundesrepublik Deutschland

Angenommen auf Antrag von:

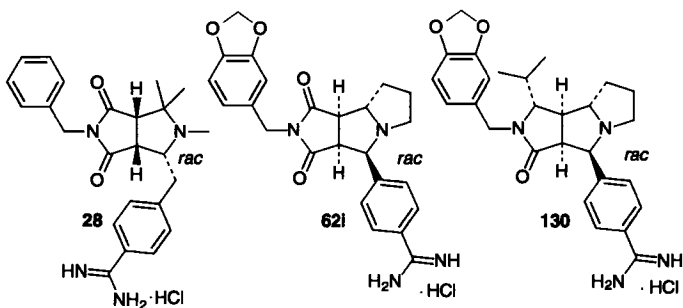
Prof. Dr. François Diederich, Referent
Prof. Dr. Andrea Vasella, Koreferent
Dr. Lutz Weber, Koreferent

Zürich 1997

Zusammenfassung

In den letzten Jahren haben sich die Methoden der modernen Wirkstoff-Forschung grundlegend gewandelt. Unter Verwendung von hochaufgelösten Röntgenstrukturanalysen therapeutisch relevanter Proteine ist es prinzipiell möglich, allein aus der sehr genauen Analyse der Bindungsstelle des Proteins im Hinblick auf zur Bindung eines Liganden wichtige Wechselwirkungen, neuartige Inhibitoren zu entwerfen. Solche *de novo*-Design-Methoden stellen eine Alternative zu den traditionellen Methoden (*Screening*) für das Auffinden neuartiger Leitstrukturen dar. Am besten geeignet für ein strukturorientiertes Design von Inhibitoren sind Proteine, die ein relativ starres aktives Zentrum mit ausgeprägten Bindungstaschen besitzen. Ein Enzym, das diese Bedingungen erfüllt, ist die Serin-Protease Thrombin, die eine zentrale Rolle im Prozeß der Blutgerinnung spielt. Eine selektive Hemmung von Thrombin könnte helfen, lebensgefährlichen thrombotischen Prozessen vorzubeugen.

Auf der Grundlage der dreidimensionalen Struktur von Thrombin wurde ein Inhibitor (**28**) entworfen, der ein nichtpeptidisches, cyclisches Grundgerüst und daran in passender räumlicher Anordnung angebrachte Seitenketten zur Bindung im aktiven Zentrum des Enzyms besitzt. Das konformativ starre Grundgerüst sollte ein Zusammenfallen der hydrophoben Seitenarme verhindern und außerdem das Molekül für eine Bindung an Thrombin präorganisieren.



Der Inhibitor **28** wurde in racemischer Form über den Schlüsselschritt einer 1,3-dipolaren Cycloaddition zwischen einem Azomethin-Ylid und einem *N*-substituierten Maleinimid synthetisiert und auf seine Aktivität gegenüber Thrombin und dem verwandten Enzym Trypsin getestet. Diese Verbindung hatte einen K_i -Wert von 18 μM für Thrombin, war aber nicht selektiv im Vergleich zur Bindung an Trypsin. Konformationell noch mehr eingeschränkte Amidiniumsalze zeigten eine deutlich

bessere Inhibitorwirkung: die aktivste Verbindung war **62i** mit einem K_i -Wert von 90 nM und einer Selektivität von 7.8 für Thrombin gegenüber Trypsin. Der Bindungsmodus von **62i** wurde bei der *Hoffmann-La Roche AG* durch eine Röntgenstrukturanalyse des Thrombin-**62i**-Komplexes aufgeklärt. Der Inhibitor bindet im aktiven Zentrum des Enzyms wie durch *Modeling*-Untersuchungen vorhergesagt; es wurde nur ein Enantiomer des racemischen Gemisches im Kristall gefunden.

Eine genaue Analyse der Struktur des Thrombin-**62i**-Komplexes, speziell im Hinblick auf ungünstige Wechselwirkungen, führte zum Design und zur Synthese einer Reihe von sehr selektiven Thrombin-Inhibitoren. Bei diesen Molekülen wurde im Vergleich zum Imid **62i** die "obere" Carbonylgruppe, die im Thrombin-**62i**-Komplex in eine hydrophobe Tasche des Enzyms bindet, modifiziert. Es zeigte sich, daß kleinere hydrophobe Gruppen (Ethyl, Isopropyl, Cyclopropyl) anstelle der oberen Carbonylgruppe von **62i** die besten Aktivitäten liefern (die K_i -Werte von 8-13 nM liegen für alle drei Verbindungen in der gleichen Größenordnung). Bei größeren Gruppen (Cyclohexyl, Phenyl) nimmt die Aktivität wieder ab. Der selektivste Inhibitor war **130** mit einer Isopropylgruppe anstelle der oberen Carbonylgruppe von **62i**. **130** hat einen K_i -Wert von 13 nM und eine 760-fach höhere Affinität zu Thrombin als zu Trypsin. Diese Verbindung kann als ein *Mimetikum des natürlichen Thrombin-Substrats Fibrinogen* angesehen werden, das mit der Benzylgruppe eines Phenylalanins (**130**: Piperonylgruppe), mit der Isopropylgruppe eines Valins (**130**: Isopropylgruppe) und der Guanidiniumgruppe eines Arginins (**130**: Amidiniumgruppe) an Thrombin bindet.

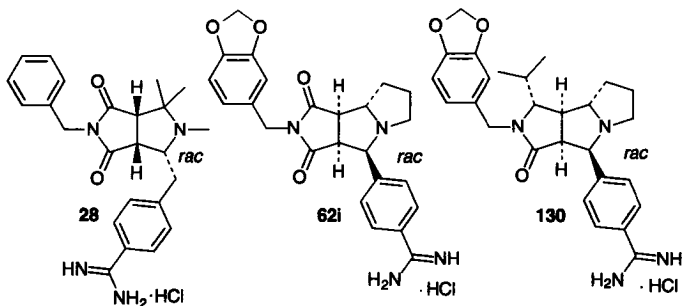
Der Bindungsmodus von **130** wurde bei der *Hoffmann-La Roche AG* durch eine Röntgenstrukturanalyse des Thrombin-**130**-Komplexes aufgeklärt. Der Inhibitor bindet im aktiven Zentrum des Enzyms wie durch *Modeling*-Untersuchungen vorhergesagt; wiederum wurde nur ein Enantiomer des racemischen Gemisches im Kristall gefunden. Eine Enantiomerentrennung des Inhibitors **130** und anschließende Tests der biologischen Aktivitäten der beiden Enantiomere ergab, daß (+)-**130** mit einem K_i -Wert von 7 nM eine 800-fach höhere Affinität zu Thrombin besitzt als (-)-**130** ($K_i = 5.6 \mu\text{M}$).

Im Rahmen dieser Dissertation ist es gelungen, mit Hilfe von *molecular-modeling*-Methoden eine neuartige Leitstruktur für Thrombin-Inhibitoren zu entwerfen. Diese Leitstruktur wurde danach so weiter optimiert, daß schließlich hochaffine und für Thrombin selektive Inhibitoren erhalten wurden. Weiterhin wurde für diese Verbindungen eine auch in größerem Maßstab praktikable Methode zur Enantiomerentrennung entwickelt.

Summary

In the past few years the methods of modern drug research have changed considerably. The availability of high-resolution X-ray structures of therapeutically relevant enzymes offers a unique opportunity for the *de novo* design of inhibitors. In principle, it is possible to design novel inhibitors solely by careful analysis of the enzyme's binding site with respect to important enzyme-inhibitor interactions. *De novo* design methods can be considered as alternatives to the traditional screening methods for lead structure finding. Enzymes that are best suited for such a rational design approach are those with rigid, well-defined binding pockets in the active site. Thrombin, a trypsin-like serine protease, which is involved in the blood coagulation process, meets these requirements. A selective inhibition of thrombin could help preventing life-threatening thrombotic diseases.

A novel thrombin inhibitor (**28**) was designed using the knowledge of the three-dimensional structure of thrombin. This inhibitor has a nonpeptidic, cyclic core structure with attached side chains in order to reach the three binding pockets present in the active site of the enzyme. A rigid scaffold was chosen to prevent a hydrophobic collapse of the side chains and preorganize the molecule for binding to thrombin.



The key step in the synthesis of the inhibitor **28** (in racemic form) was a 1,3-dipolar cycloaddition between an azomethine ylide and a *N*-substituted maleimide. **28** was tested for activity against thrombin and the related serine protease trypsin. It was found to have a K_i of 18 μM for thrombin, but did not show selectivity versus trypsin. Conformationally more restricted analogs were significantly better inhibitors: the most active compound being **62i** with a K_i of 90 nM and a selectivity of 7.8 for thrombin compared to trypsin.

The binding mode of the most active compound **62i** was elucidated at the *Hoffmann-La Roche AG* by X-ray crystallography of the thrombin-inhibitor complex. The inhibitor was bound in the active site as predicted from modeling experiments. Only one enantiomer of the racemic mixture was found in the crystal.

A careful analysis of the thrombin-**62i** complex, paying special attention to unfavorable interactions, led to the design and synthesis of a series of highly selective inhibitors. In imide **62i**, the “upper” carbonyl group which binds into a hydrophobic pocket in the thrombin-**62i** complex, was systematically modified. Compounds bearing smaller hydrophobic groups (ethyl, isopropyl, cyclopropyl) instead of the carbonyl group were found to be the most active inhibitors of this series. These inhibitors have K_i -values between 8-13 nM. A substantial loss of activity was detected for inhibitors with larger substituents (cyclohexyl, phenyl) positioned to bind in the P-pocket of thrombin. The most selective inhibitor was **130** with an isopropyl group instead of the upper carbonyl group of **62i**. This compound has a K_i of 13 nM and a selectivity of 760 for thrombin compared to trypsin. Compound **130** can be considered to mimic the binding mode of the natural thrombin substrate fibrinogen. Fibrinogen binds with a phenyl group of a phenylalanine (**130**: piperonyl), with the isopropyl group of a valine (**130**: isopropyl), and with the guanidinium side chain of an arginine residue (**130**: amidinium group) in the active site of thrombin.

The binding mode of **130** was elucidated by X-ray crystallography of the thrombin-inhibitor complex at the *Hoffmann-La Roche AG*. The inhibitor was bound in the active site in the way predicted by modeling experiments. Again, only one enantiomer of the racemic mixture was found in the crystal. Consequently, a resolution of **130** was carried out. Enantiomer (+)-**130**, having a K_i -value of 7 nM and a selectivity of 740, is 800-fold more active than (-)-**130** ($K_i=5.6 \mu\text{M}$, selectivity 21).

In summary, a novel class of nonpeptidic, highly active and selective thrombin inhibitors has resulted from structure-based design and subsequent improvement of the initial lead molecule. Furthermore, a method for the optical resolution of the inhibitors was developed that can be easily applied for the preparation of larger quantities of enantiomerically pure material.