



Doctoral Thesis

Strukturbasiertes Design und Synthese nichtpeptidischer Thrombin-Inhibitoren

Author(s):

Betschmann, Patrick

Publication Date:

2000

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004040585> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 13890

**Strukturbasiertes Design und Synthese nichtpeptidischer
Thrombin-Inhibitoren**

ABHANDLUNG
zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

Patrick Betschmann

Dipl. Chem ETH
geboren am 21. Dezember 1971
von Siglistorf (AG)

Angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. François Diederich, Referent
Prof. Dr. Bernhard Jaun, Korreferent

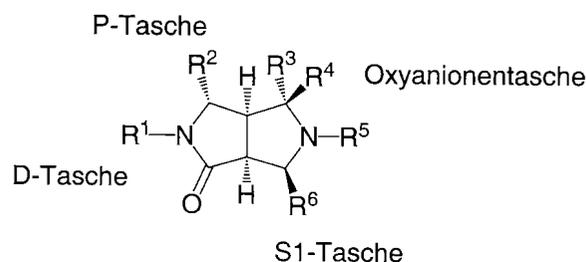
Zürich 2000

Zusammenfassung

Thrombotische Ereignisse sind eine der Haupttodesursachen in der entwickelten Welt. Die Trypsin-ähnliche Serinprotease Thrombin spielt bei Hämostase und Thrombose eine zentrale Rolle und stellt daher einen wichtigen Angriffspunkt für antithrombotische Therapien dar. Wegen der bedeutenden Nachteile der heute zur Verfügung stehenden Gerinnungshemmer ist die Entwicklung neuer potenter, selektiver und oral bioverfügbarer Thrombinhemmer ein wichtiges Gebiet der gegenwärtigen pharmazeutischen Forschung.

Thrombin wird als idealer Kandidat für das strukturbasierte Entwerfen von Inhibitoren angesehen, da Röntgenkristallstrukturen von Enzym-Inhibitor-Komplexen ein allgemein starres Protein mit gut ausgeprägten Bindungstaschen im aktiven Zentrum zeigen. Durch rationales Inhibitor-design, basierend auf Proteinkristallographie und *Molecular Modeling*, wurde versucht, Aktivität, Selektivität und potentielle orale Bioverfügbarkeit einer Klasse von reversibel und nichtkovalent bindenden, nichtpeptidischen Thrombin-Inhibitoren zu verbessern.

Die typische Struktur besteht aus einem starren bi- oder tricyclischen Gerüst mit mehreren Substituenten (Vektoren) R^1 - R^6 , welche in den vier Haupttaschen des aktiven Zentrums gebunden werden (R^1 = Aryl; R^2 , R^3 , R^5 = Alkyl; R^4 = Alkyl oder H; R^6 = 4-Phenylamidinium). Wie in vielen anderen Thrombin-Inhibitoren enthält der S1-bindende Substituent R^6 eine stark basisch Gruppe. Da mangelhafte orale Bioverfügbarkeit von *in vivo* wirksamen Stoffen oftmals durch geladene Molekülgruppen bedingt ist, wurde eine Reihe von Analogen mit weniger basischen oder neutralen R^6 -Substituenten entworfen und synthetisiert mit dem Ziel der Erhöhung der potentiellen oralen Bioverfügbarkeit bei genügender Restaktivität.



Die Schlüsselreaktion einer typischen Synthese bestand aus der 1,3-dipolaren Cycloaddition eines Azomethin-Ylids mit einem *N*-substituierten Maleinimid. Moderne Pd-katalysierte Kreuzkupplungsmethodologie wurde erfolgreich zur Kohlenstoff-Heteroatom-Bindungsbildung eingesetzt. Leider waren die meisten R^6 -Analoge inaktiv, vermutlich wegen der fehlenden positiven Ladung oder ungenügender geometrischer Ähnlichkeit zu 4-Phenylamidinium. Es wurde angenommen, dass das starre und selbst

fest gebundene bi- oder tricyclische Gerüst zwar für Phenylamidinium optimiert ist, nun aber seine Lage nicht genügend anzupassen vermag, um einem anderen Substituenten in der S1-Tasche das Ausbilden der erwarteten günstigen Wechselwirkungen zu ermöglichen.

Literaturdaten und *Modeling*-Studien deuten darauf hin, dass die hydrophobe D-Tasche leicht auch grösseren R¹-Substituenten als dem bisher verwendeten Piperonyl Platz böte. Bei der Synthese einer *N*-Diarylmethyl-substituierten Verbindung nach bewährter Vorgehensweise wurde festgestellt, dass sich die Sperrigkeit einer solchen Gruppe nachteilig auf Ausbeuten und Stereoselektivitäten auswirkte. Schliesslich wurde eine neue Strategie entwickelt, welche die Einführung sterisch anspruchsvoller R¹-Substituenten in einem der letzten Schritte ermöglichte. Die Affinität zu Thrombin wurde durch R¹-Variation nur geringfügig beeinflusst, die Selektivität gegenüber der unerwünschten Inhibition der verwandten Serinprotease Trypsin hingegen wurde verbessert. *N*-Benzhydryl-Substitution ergab den selektivsten Inhibitor dieser Klasse.

Trotz ihrer Möglichkeiten, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, wird die Oxyanionentasche nur selten als Bindungsstelle für nichtkovalente Inhibitoren genutzt. Für ω -funktionalisierte Alkylsubstituenten R³ und R⁵ wurden günstige Wechselwirkungen mit Aminosäuren rund um das katalytisch aktive Zentrum vorhergesagt, doch leider konnten weder die Aktivität noch die Selektivität verbessert werden. Hier könnte wiederum die hohe Präorganisation und die konformationelle Starrheit des fest gebundenen Gerüsts die neuen Substituenten davon abhalten, eine Position einzunehmen, welche zusätzliche Wechselwirkungen zuliesse. Es wurde jedoch festgestellt, dass die Oxyanionentasche und ihre Nachbarregion, die S1'-Tasche, in der Lage sind, auch grosse Gruppen aufzunehmen. Dies eröffnet eine Fülle von Möglichkeiten für weitergehende Forschung.

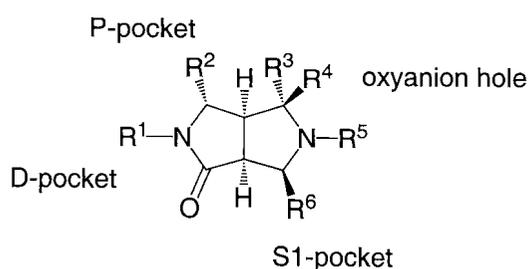
Abstract

Thrombotic disorders are a major cause of mortality in the developed world. The trypsin-like serine protease thrombin plays a central role in hemostasis and thrombosis, thereby constituting an important target for antithrombotic therapies. With currently available anticoagulants suffering from major drawbacks, the development of new potent, selective, and orally bioavailable thrombin inhibitors is an important focus of present pharmaceutical research.

Thrombin is believed to be an ideal candidate for structure-based inhibitor design, as X-ray crystal structures of enzyme-inhibitor complexes show well-defined binding pockets in the active site of an overall rigid protein. Utilizing the tools of protein

crystallography and molecular modeling to guide rational inhibitor design, several attempts were made to improve biological activity, target selectivity, and potential oral bioavailability of a class of reversibly and non-covalently binding, non-peptidic thrombin inhibitors.

A typical structure consists of a rigid bi- or tricyclic scaffold with several substituents (vectors) R^1 - R^6 for binding in the four major pockets of the enzyme active site (R^1 = aryl; R^2 , R^3 , R^5 = alkyl; R^4 = alkyl or H; R^6 = 4-phenylamidinium). As in many other thrombin inhibitors, the substituent that binds in the S1-pocket (R^6) contains a highly basic functionality. Since poor oral bioavailability of drugs effective *in vitro* can often be attributed to charged groups in the molecule, a series of analogs bearing less basic or neutral R^6 substituents was designed and synthesized, aiming at potentially orally bioavailable compounds retaining satisfactory inhibitory activity.



The key step of a typical synthesis consisted of a 1,3-dipolar cycloaddition of an azomethine ylide and an *N*-substituted maleimide. Modern Pd-catalyzed cross-coupling methodology was successfully applied for carbon-heteroatom bond formation. Unfortunately, most of the R^6 -analogs were found to be inactive, probably due to the lack of a positive charge or steric similarity to 4-phenylamidinium. It was assumed that the rigid and itself tightly bound bi- or tricyclic scaffold, being optimized for the phenylamidinium group, cannot sufficiently adjust its position to allow a different S1-pocket substituent to form the predicted favorable interactions with the enzyme.

Literature reports and modeling studies indicated that the hydrophobic D-pocket would be spacious enough to easily accommodate larger R^1 substituents than the previously used piperonyl group. During the synthesis of an *N*-diarylmethyl-substituted compound according to an established synthetic protocol, it became apparent that the bulkiness of such a group had detrimental effects on yields and stereoselectivity. Ultimately, a new strategy was developed, which allowed the introduction of sterically demanding R^1 substituents as one of the final steps. Affinity towards thrombin was only modestly influenced by R^1 variation, but selectivity over the undesired inhibition of the related serine protease trypsin was improved. *N*-Benzhydryl substitution afforded the most selective thrombin inhibitor within this class of compounds.

Despite its hydrogen bonding capabilities, the oxyanion hole has rarely been used as a binding site for non-covalent inhibitors. ω -Functionalized alkyl substituents R^3 and

R⁵ were predicted to favorably interact with amino acid residues lining the catalytic site. Unfortunately, neither activity nor selectivity could be improved. Here again, the high degree of preorganization and the rigidity of the tightly bound scaffold may prevent the new substituents from assuming a position that would allow favorable interactions. However, the oxyanion hole and the S1'-pocket next to it were found to be capable of accommodating quite large groups. This leaves much room for further exploration.