



Doctoral Thesis

## **Strukturbasiertes Design und Synthese von nichtpeptidischen Inhibitoren der Serinprotease Thrombin**

**Author(s):**

Schärer, Kaspar

**Publication Date:**

2005

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004897699> →

**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. 15820

**Strukturbasiertes Design und Synthese von nichtpeptidischen  
Inhibitoren der Serinprotease Thrombin**

**ABHANDLUNG**

zur Erlangung des Titels

**DOKTOR DER WISSENSCHAFTEN**

der

**EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH**

vorgelegt von

**Kaspar Schärer**

Dipl. Chem. ETH

geboren am 4. Mai 1975

von Zollikon (ZH)

Angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. François Diederich, Referent

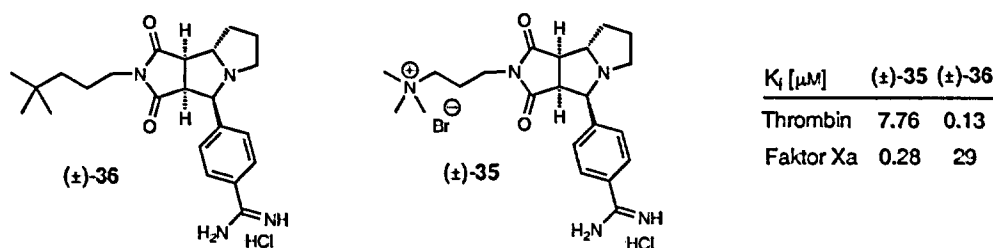
Prof. Dr. Peter. H. Seeberger, Korreferent

Zürich 2005

## Zusammenfassung

Thrombotische Ereignisse sind eine der Haupttodesursachen in den industrialisierten Ländern. Die Hemmung der Trypsin-ähnlichen Serinprotease Thrombin als Schlüsselenzym der Blutgerinnungskaskade ist ein geeigneter Ansatz für die Entwicklung antithrombotischer Medikamente. Eine selektive Hemmung von Thrombin könnte helfen, lebensgefährlichen thrombotischen Ereignissen vorzubeugen. Thrombin wird als idealer Kandidat für das strukturbasierte Entwerfen von Inhibitoren angesehen, da Röntgenkristallstrukturen von Thrombin-Inhibitor-Komplexen ein allgemein starres Protein mit sehr gut ausgeprägten Bindungstaschen im aktiven Zentrum zeigen. Durch rationales Inhibitor-design, basierend auf Proteinkristallographie und *Molecular Modeling*, wurde versucht, Aktivität und Selektivität einer Klasse von tricyclischen nichtpeptidischen Thrombin-Inhibitoren zu verbessern. Weiter sollten biologische Resultate Aufschluss geben über die Natur und Stärke zwischenmolekularer Wechselwirkungen.

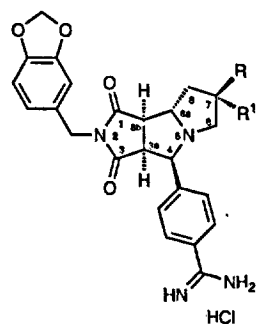
In einem ersten Ansatz wurde versucht, den Indolring von Trp215 in der grossen hydrophoben D-Tasche zur Ausbildung von Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen heranzuziehen, um diese in einem aktiven Zentrum eines Enzyms zu untersuchen. Modellanalysen entsprechend wurde in der D-Tasche das quaternäre Ammoniumion des tricyclischen Inhibitors ( $\pm$ )-35 direkt über dem Indolring von Trp215 plaziert. Die biologische Aktivität des kationischen Inhibitors ( $\pm$ )-35 wurde mit derjenigen des entsprechenden Neutramoleküls ( $\pm$ )-36 verglichen.



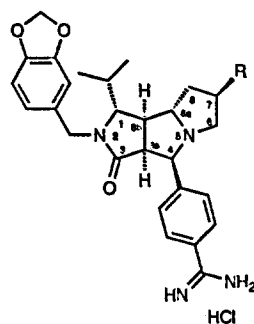
Die gemessenen biologischen Aktivitäten zeigen, dass die Kation- $\pi$ -Wechselwirkung mit einem aromatischen Ring in der D-Tasche nicht ausreicht, um die notwendige Desolvatationsenergie des Kations zu kompensieren und somit zu festerer Bindung zu führen. Die Kation- $\pi$ -Wechselwirkung von ( $\pm$ )-35 mit drei aromatischen Ringen (Trp, Phe, Tyr) im aktiven Zentrum von Faktor Xa, einer

anderen Serinprotease aus der Blutgerinnungskaskade, verursacht hingegen eine dramatische Aktivitätssteigerung. Währenddessen Thrombin alkyliertes ( $\pm$ )-36 um einen Faktor 60 ( $\Delta\Delta G = 1.6$  kcal/mol) besser bindet als die Ammoniumverbindung ( $\pm$ )-35, inhibiert letztere den Faktor Xa um das hundertfache besser ( $\Delta\Delta G = 2.8$  kcal/mol). Somit konnte im aktiven Zentrum von Faktor Xa die Wirksamkeit der Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen eindrücklich nachgewiesen werden.

Trotz ihrer Möglichkeiten, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, wird die Oxyanionentasche nur selten als Bindungsstelle für nichtkovalente Inhibitoren genutzt. Eine Reihe racemischer (( $\pm$ )-78, ( $\pm$ )-95, ( $\pm$ )-96, ( $\pm$ )-97) und zwei enantiomerenreine Inhibitoren ((+)-77, (+)-102) mit einem C(7)-Substituenten für die Oxyanionentasche wurde synthetisiert. Der Aufbau des tricyclischen Gerüsts enantiomerenreiner Inhibitoren erfolgte über eine 1,3-dipolare Cycloaddition eines chiralen, nichtracemischen Azomethin-Ylids an ein *N*-substituiertes Maleinimid. Der Schlüsselschritt der Synthese war die Trennung des in der Cycloaddition erhaltenen *Pseudoenantiomerenpaares* durch einen Schutzgruppen-Einführungs/Abspaltungsprozess.



- ( $\pm$ )-78 R = H, R<sup>1</sup> = OH  
 ( $\pm$ )-96 R = H, R<sup>1</sup> = OMe  
 ( $\pm$ )-97 R = H, R<sup>1</sup> = OBn  
 ( $\pm$ )-95 R = R<sup>1</sup> = OMe  
 (+)-102 R = OH, R<sup>1</sup> = H  
 ( $\pm$ )-32 R = H, R<sup>1</sup> = H



- (+)-77 R = OH  
 (+)-33 R = H

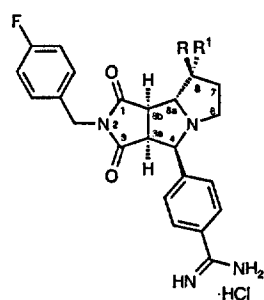
Inhibitor	K <sub>i</sub> [nM]	Selektivität
(+)-77	9	1055
( $\pm$ )-32	90	7.8
(+)-33	7	760
( $\pm$ )-78	100	33
( $\pm$ )-95	720	32
( $\pm$ )-96	710	35
( $\pm$ )-97	1100	3.6
(+)-102	36	50

Die Einführung einer OH-Gruppe an C(7) im Inhibitor ( $\pm$ )-78 und (+)-102 verändert die Aktivität gegenüber dem unsubstituierten Imid-Inhibitor ( $\pm$ )-32 nicht wesentlich. Dieselbe Feststellung gilt auch auf der Stufe der Lactam-Inhibitoren ((+)-77 versus (+)-33). Die Selektivität gegenüber Trypsin wird sowohl in den tricyclischen Imid- als auch in den Lactam-Inhibitoren erhöht. Verbindung (+)-77 ist einer der stärksten und selektivsten Inhibitoren seiner Klasse.

Die Einführung von weniger polaren Substituenten an C(7) (MeO and BnO in ( $\pm$ )-96 und ( $\pm$ )-97) reduziert die Aktivität um einen Faktor 7-11 im Vergleich mit ( $\pm$ )-32. Die Einführung von kleinen Substituenten an C(7) (( $\pm$ )-78, ( $\pm$ )-95, ( $\pm$ )-96, (+)-102) erhöht die Selektivität gegenüber Trypsin, während sie ein grosser Substituent wie BnO (( $\pm$ )-97) herabsetzt.

Das durch Modellanalysen vorhergesagte Bindungsmuster für (+)-77 und (+)-102 wurde in einer Kristallstruktur des Enzyms mit (+)-102 nicht bestätigt. Erwartet wurde die H-Brückenwechselwirkung zwischen der C(7)-OH-Gruppe mit dem in der Oxyanionentasche kristallographisch jeweils beobachteten Wassermolekül. Gefunden wurde hingegen, dass die Propionat-Seitenkette von Glu192, welche im Thrombin-(+)-33-Komplex (und im erwarteten Bindungsmodus für (+)-77 und (+)-102) zur Proteinoberfläche und nicht in Richtung des Prolin-Rings des Tricyclus plaziert ist, sich im Thrombin-(+)-102-Komplex unter Bildung einer sehr kurzen H-Brücke zur OH-Gruppe an C(7) neu orientiert. Der Beitrag zur freien Bindungsenergie der so ausgebildeten, kurzen ionischen (2.4 Å) H-Brücke ist jedoch sehr klein, da sich diese an der Oberfläche des Enzyms befindet und in erster Linie die vorgängige Solvatation der Propionat-Seitenkette durch Wassermoleküle kompensiert.

Zu einer Reihe von C(8)-fluorierten Inhibitoren ((+)-109-(+)-111) mit einem 4-Fluorbenzylrest in der D-Tasche wurden analoge, am C(8)-Atom hydroxylierte und methoxylierte Inhibitoren ((+)-112-(+)-115 und ( $\pm$ )-128) synthetisiert.



Inhibitor	R	R <sup>1</sup>	K <sub>i</sub> [μM]
(+)-109	F	H	0.30
(+)-110	H	F	0.45
(+)-111	F	F	0.71
(+)-112	OH	H	0.32
(+)-113	OMe	F	0.28
(+)-114	H	OH	2.71
(+)-115	H	OMe	0.33
(+)-128	OMe	OMe	0.59

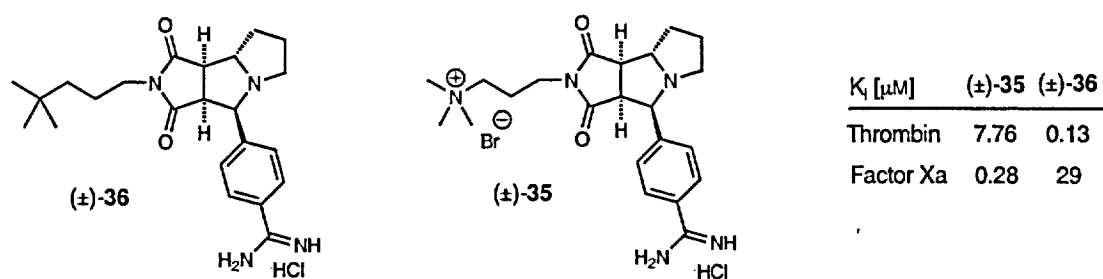
Alle neuen, am C(8)-hydroxylierten oder methoxylierten Inhibitoren wiesen, mit einer Ausnahme ((+)-114), zu den C(8)-fluorierten Inhibitoren sehr ähnliche Aktivitäten auf. Gründe für diese markant tiefere Aktivität der Verbindung (+)-114 konnten mit Modellanalysen eruiert werden. Der C-F-Dipol in Verbindung (+)-110 wechselwirkt günstig in annähernd orthogonaler Geometrie mit einem der partiell

positiv geladenen (elektrophilen) Imidazolium-*N*-Atome von His57 der katalytischen Triade. Dieselbe Wechselwirkung kann auch Verbindung (+)-115 eingehen, da es genügend Raum für den Me-Rest gibt. Obwohl die OH-Gruppe in (+)-114 ebenfalls mit dem elektrophilen Stickstoff von His57 wechselwirken kann, ist ein grosser Aktivitätsabfall feststellbar. In der Umgebung der OH-Gruppe gibt es keinen H-Brücken-Akzeptor für das Proton, und somit wird die Desolvatation der OH-Gruppe nicht durch interne Solvatation im Komplex kompensiert, was zum Verlust an freier Bindungsenthalpie führt. Insgesamt liefern diese Ergebnisse interessante Einsichten in die Natur orthogonaler multipolarer Wechselwirkungen.

## 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, and thereby constitutes an important target for antithrombotic therapies. The selective inhibition of thrombin could prevent life-threatening thrombotic diseases. Thrombin is an ideal candidate for structure-based inhibitor design, as X-ray crystal structures of enzyme-inhibitor complexes show well-defined binding pockets within the active site of an overall rigid protein. Utilizing protein crystallography and molecular modeling as guides in a rational inhibitor design, several attempts were made to improve biological activity, target selectivity, and potential oral bioavailability of a class of tricyclic non-peptidic thrombin inhibitors. Furthermore, biological assays should provide information on nature and potency of non-covalent intermolecular interactions.

In a first approach, the aromatic indole heterocycle of Trp215 in the hydrophobic D-pocket was chosen to explore the cation- $\pi$  interaction in the active center of an enzyme. Molecular modeling accommodated the quaternary ammonium ion of the tricyclic inhibitor ( $\pm$ )-35 directly on top of the indole unit of Trp215. The biological activity of the cationic inhibitor ( $\pm$ )-35 was compared with that of the corresponding neutral counterpart ( $\pm$ )-36.

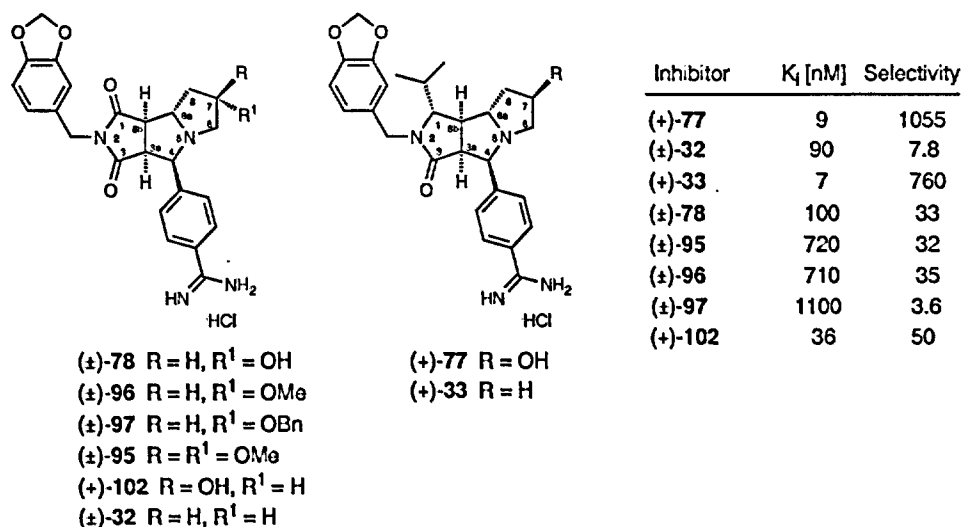


Biological assays revealed that the cation- $\pi$  interaction with a single aromatic ring is not sufficient to compensate for the desolvation of the cation and to lead to a higher binding affinity. In contrast, the cation- $\pi$  interaction between ( $\pm$ )-35 and three aromatic rings (Trp, Phe, Tyr) in the active center of factor Xa, another serine protease in the blood coagulation cascade, dramatically increases the activity.

Whereas compound ( $\pm$ )-36 with its alkyl residue has a higher affinity for thrombin as compared to factor Xa (factor 60,  $\Delta\Delta G = 1.6$  kcal/mol), the latter is inhibited much more efficiently by the ammonium ion ( $\pm$ )-35 than by ( $\pm$ )-36 (factor 100,  $\Delta\Delta G = 2.8$  kcal/mol). These values impressively demonstrate the efficacy of the cation- $\pi$  interaction in the active center of factor Xa.

Despite its hydrogen bonding capabilities, the oxyanion hole has rarely been used as a binding site for non-covalent inhibitors. A series of racemic (( $\pm$ )-78, ( $\pm$ )-95, ( $\pm$ )-96, ( $\pm$ )-97) and two enantiomerically pure inhibitors ((+)-77 and (+)-102), directing a C(7)-substituent into the oxyanion hole, were synthesized. The tricyclic scaffold of enantiomerically pure inhibitors was obtained by a 1,3-dipolar cycloaddition between a chiral, nonracemic azomethine ylide and an *N*-substituted maleimide.

The key step of the synthesis was the separation of a pair of "pseudoenantiomers" obtained in the cycloaddition reaction using a protection/deprotection strategy.



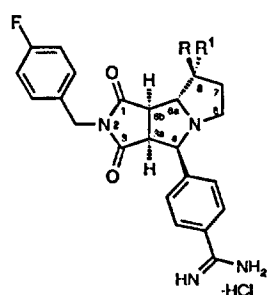
The affinity for thrombin is not much altered by the introduction of an OH group at C(7) at the stage of the imide derivatives (( $\pm$ )-78 and (+)-102) when compared with the C(7)-unsubstituted inhibitor ( $\pm$ )-32. The same conclusion is valid at the stage of the lactam inhibitors ((+)-77 vs (+)-33). The introduction of an OH group at C(7) increases the selectivity for thrombin over trypsin in both the tricyclic imide and the lactam type inhibitors. Inhibitor (+)-77 is one of the most potent thrombin inhibitors in the tricyclic lactam series.



Introduction of less polar substituents at C(7) (MeO in ( $\pm$ )-96 and BnO in (+)-97) reduces the activity by a factor of 7-11 as compared to ( $\pm$ )-32. The introduction of small substituents at C(7) (( $\pm$ )-78, ( $\pm$ )-95, ( $\pm$ )-96, ( $\pm$ )-102) increases the selectivity for thrombin over trypsin, whereas a larger, less polar BnO-substituent at this position (( $\pm$ )-97) not only lowers the binding affinity, but also the selectivity.

The binding mode predicted by modeling for (+)-77 and (+)-102 was not confirmed by an X-ray crystal structure of thrombin with (+)-102. It was expected that the OH group at C(7) would form a hydrogen bond to the crystallographically observed water molecule in the oxyanion hole. However, it was found for the complex between thrombin and (+)-102 that the propionate side chain of Glu192, which, in the complex with (+)-33 (as well as in the predicted binding mode for (+)-77 and (+)-102), is oriented towards the protein surface and pointing away from proline ring, is oriented towards the C(7)-OH of (+)-102 group with formation of a very short ionic H-bond. But the gain in binding free enthalpy resulting from this additional short (2.4 Å) intermolecular ionic H-bond is negligible because it is located near the surface of the protein. This means that the propionate side chain mainly exchanges original favorable H-bonds to surrounding water molecules for the observed H-bond to the ligand.

With a series of C(8)-fluorinated inhibitors ((+)-109-(+)-111), containing a 4-fluorobenzyl-substituent directed into the D-pocket in hands, a number of C(8)-methylated and methoxylated analogs ((+)-112-(+)-115 and ( $\pm$ )-128) were synthesized.



Inhibitor	R	R <sup>1</sup>	K <sub>i</sub> [ $\mu$ M]
(+)-109	F	H	0.30
(+)-110	H	F	0.45
(+)-111	F	F	0.71
(+)-112	OH	H	0.32
(+)-113	OMe	F	0.28
(+)-114	H	OH	2.71
(+)-115	H	OMe	0.33
(+)-128	OMe	OMe	0.59

With one exception ((+)-114), all inhibitors hydroxylated or methoxylated at C(8) displayed similar activities as the C(8)-fluorinated inhibitors. Modeling-analyses showed that the C-F dipole of (+)-110 interacts favorably in a nearly orthogonal geometry with one of the partially positively charged (electrophilic)

imidazolium *N*-atoms of His57. The same interaction is possible with compound (+)-115, given that there is enough space for the Me-substituent. Despite the fact that the C(7)-OH group of (+)-114 can also interact with the electrophilic *N*-Atom of His57, a strong decrease in activity was measured. There is no H-bond acceptor in the surroundings of the OH and, hence, there is no compensation for the desolvation of the latter by intra-complex solvation and a dramatic loss of binding free enthalpy results. In summary, these results provide a deeper insight into the nature of orthogonal multipolar interactions.