



## Doctoral Thesis

# Design, synthesis, and biological evaluation of novel bisubstrate inhibitors of catechol-O-methyltransferase (COMT)

**Author(s):**

Ellermann, Emanuel

**Publication Date:**

2010

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006086147> →

**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 No. 18906

---

# Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Bisubstrate Inhibitors of Catechol-*O*-Methyltransferase (COMT)

---

A dissertation submitted to the  
ETH ZURICH  
For the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES

Presented by  
**Manuel Ellermann**

Dipl. Chem. Philipps-University Marburg  
Born May 1<sup>st</sup>, 1980  
Citizen of the Federal Republic of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. François Diederich, examiner  
Prof. Dr. Donald Hilvert, co-examiner  
Dr. Roland Jakob-Roetne, co-examiner

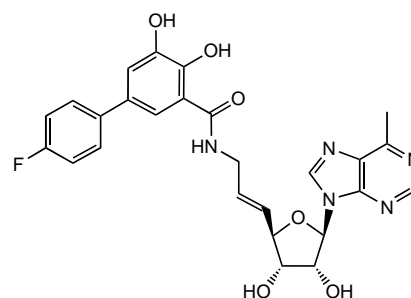
Zurich 2010

## Abstract

Biologically active catechols, such as L-Dopa and the neurotransmitter dopamine, are inactivated by methylation, catalyzed by the enzyme catechol-*O*-methyltransferase (COMT) in the presence of *S*-adenosylmethionine (SAM) and Mg<sup>2+</sup>. Small nitrocatechol-based inhibitors of COMT are utilized in the treatment of Parkinson disease, by blocking undesired methylation of administered L-Dopa, thereby enhancing dopamine levels in the brain. Recent studies have indicated additional therapeutic applications of COMT inhibition in other central nervous system disorders, such as schizophrenia and depression. COMT has thus been studied for decades and X-ray structural information of the apo-enzyme, the holo-enzyme, and of complexes of the enzyme with mono- and bisubstrate inhibitors are available.

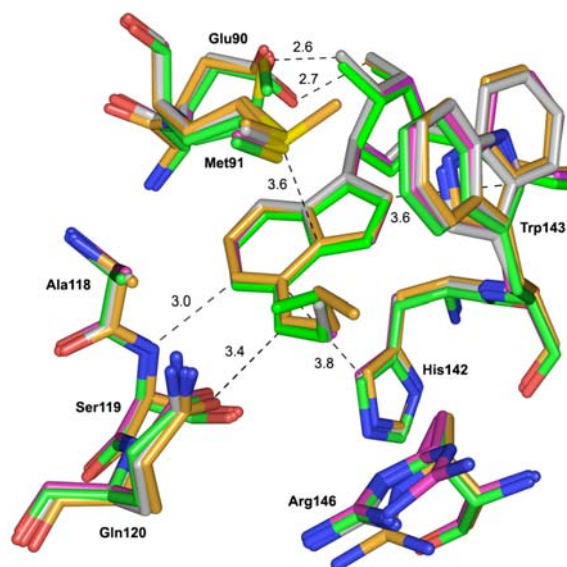
Herein, the molecular recognition properties of the uninvestigated regions of the active site of COMT were explored by structural alterations of bisubstrate inhibitors. An investigation of the adenosine-binding site was carried out, including screening of the adenine-binding site, the ribose-binding site and two novel, so far overlooked sites at the periphery of the adenosine moiety. A series of novel bisubstrate inhibitors, with replacements for the adenine nucleobase, were synthesized successfully and evaluated *in vitro*.

During the course of this work, it was discovered that the adenine-binding site needs occupancy by a substituent for efficient binding. A hydrogen bond acceptor at the N(1)-position of adenine is needed, preferentially a heterocyclic nitrogen atom. A substitution with an oxygen atom is unfavorable. The purine heterocycle is a very good nucleobase for a replacement of adenine, especially when substituted at position C(6) with a methyl or methylamino group. The high activity of the C(6) substituted purine inhibitors shifted the focus onto the previously unstudied small pocket that contains a water molecule next to the adenine moiety.



The water molecule (H<sub>2</sub>O<sub>9</sub>) located in close proximity to the adenine was found to be in an unusual environment and thus displayed two hydrogen bonds to the ligand but none towards the protein. However, short distances to nonpolar carbon atoms are present (2.8 and 2.9 Å). This water molecule was thus classified as a so far overlooked type of water in

medicinal chemistry: ligand-bound water. A search in the PDB revealed that this class of water molecule is quite abundant in X-ray crystal structures and thus of great importance for drug design and development. A favorable replacement of this water molecule was anticipated and thus a series of novel N(6)-alkyl bisubstrate inhibitors were synthesized and evaluated. They all display a very high, similar binding strength towards COMT. This cannot be attributed to the change in hydrophilicity of the ligands; no correlation of  $\log D$  and  $IC_{50}$  values is observed. Four X-ray co-crystal structures of these ligands confirmed a successful water replacement by the N(6)-alkyl residues. These were the first crystal structures of a bisubstrate inhibitor without a nitro group at the catechol. All N(6)-substituted inhibitors bind in the same way as the *s-trans* conformer, into the small pocket generated by the water replacement. However, the *s-cis* conformer is the preferred geometry in solution.



The *s-cis* – *s-trans* equilibrium was investigated by NMR in solution, resulting in a minimum  $\Delta G$  of  $1.8 \text{ kcal mol}^{-1}$  ( $\Delta G = -RT \ln K$ ;  $K = 95/5$ ) at 310 K. Despite the energetic difference between the *s-cis* – *s-trans* conformers, non-alkylated and N(6)-alkylated ligands all form complexes of similar stabilities with the protein. The costs of the unfavorable conformation upon binding must thus be compensated by the energetic gain resulting from the replacement of water by the N(6)-alkyl substituent in the bound *s-trans* form, which therefore provides a gain in binding free enthalpy of at least  $\Delta\Delta G = -1.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Thus, a lower energetic limit for the displacement of the water molecule was determined.

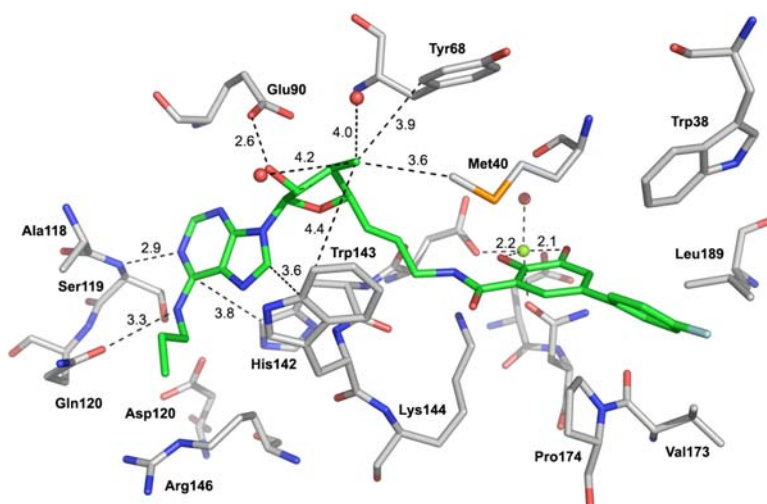
A simple flip of Gln120 towards the surface of the enzyme, induced by inhibitors with a sterically more demanding substituent at position 6 of the purine ring, was expected to lead to a more hydrophobic pocket with a concomitant increase in volume. According to computational analysis, various 6-aryl purine inhibitors displayed a good binding mode. The biological evaluation of these inhibitors revealed that all ligands are inactive. Thus, the small

pocket in the periphery of the adenine-binding site does not tolerate large guests, unfortunately.

Another so far unstudied pocket on the periphery of the known binding site was identified. It is a hydrophobic cleft ranging from the ribose moiety to the surface of the enzyme and is conserved as identified by comparison of several X-ray co-crystal structures. Novel inhibitors, with a substituent at the 3'-position of the ribose to bind into that pocket, were synthesized and evaluated.

Bisubstrate inhibitors bearing a 3'-*p*-thiocresol substituent did not inhibit COMT strongly ( $IC_{50} = 15 \mu\text{M}$ ). Computational analysis indicates a hydrophobic collapse of the inhibitors in solution, resulting in a reduced biological activity.

Bisubstrate inhibitors with 3'-*endo*-fluorine substituents and 3'-*endo*-methyl substituents were synthesized. The fluorine substituent acidifies the 2'-OH and supposedly increases the binding strength of the hydrogen bond to Glu90 and an inhibitor with a very good potency was obtained, showing that the introduction of the fluorine residue indeed is a favorable alteration. The methyl residue undergoes favorable hydrophobic interactions with Trp, Met, and the two Tyr residues in that environment. The biological evaluation again showed that one bisubstrate inhibitor is highly potent. The high activity shows that the introduction of a 3'-*endo*-methyl substituent affords favorable interactions to the protein. X-ray co-crystal structures of these ligands confirmed the binding modes of the fluorine and methyl substituted inhibitors.

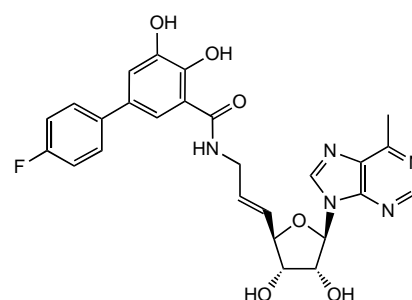


## Zusammenfassung

Biologisch aktive Catechole wie L-DOPA und der Neurotransmitter Dopamin werden durch Methylierung inaktiviert. Diese Reaktion wird in Gegenwart von *S*-Adenosylmethionin (SAM) und  $Mg^{2+}$  von dem Enzym Catechol-*O*-methyltransferase (COMT) katalysiert. Bei der Behandlung der Parkinsonschen Krankheit kommen niedermolekulare Nitrocatecholinhhibitoren zum Einsatz, um die ungewollte Methylierung des verabreichten L-DOPAs zu verhindern und dadurch die Dopaminkonzentration im Gehirn zu erhöhen. Neuere Studien haben gezeigt, dass die Hemmung von COMT auch bei anderen Krankheiten des zentralen Nervensystems, wie Schizophrenie oder Depression, Anwendung finden kann. Daher wurde COMT über Jahrzehnte untersucht und Kristallstrukturen des Apoenzyms, des Holoenzym und von Komplexen mit Mono- und Bisubstratinhibitoren sind verfügbar.

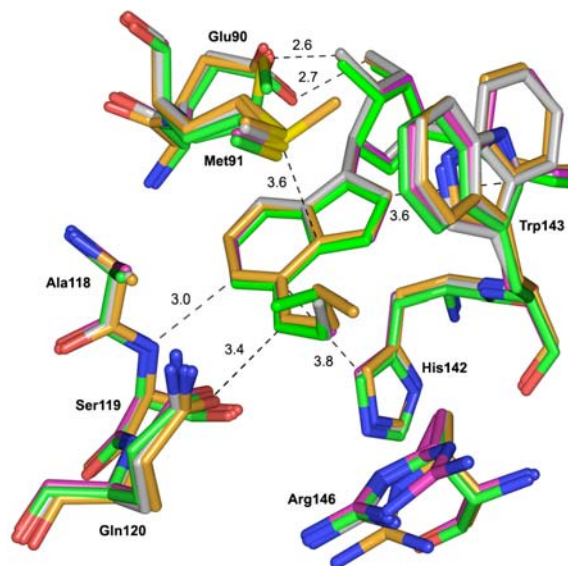
Eine detaillierte Untersuchung der molekularen Erkennung von bislang unbeachteten Regionen des aktiven Zentrums des Enzyms wurde durch Veränderung der Struktur der Bisubstratinhibitoren durchgeführt. Die Adenosin-Bindungstasche wurde betrachtet, welche die Adenin-, die Ribose- und zwei bislang völlig übersehene Sub-Bindungstaschen an der Peripherie beinhaltet. Eine Serie neuer Bisubstratinhibitoren mit neuen Strukturelementen als Ersatz für Adenosin wurde designed, synthetisiert und *in vitro* evaluiert.

Die Adenin-Bindungstasche muss mit einem Substituent gefüllt werden um eine gute Affinität zu erzielen, zusätzlich ist ein Wasserstoffbrückenakzeptor, insbesondere heterozyklischer Stickstoff, in der Position des N(1) wichtig. Eine Substitution mit Sauerstoff ist ungünstig. Purin ist ein guter Ersatz für das Adeningerüst, besonders wenn es in Position 6 mit Methyl- oder Methylaminoresten ausgestattet ist. Die hohe biologische Aktivität dieser C(6)-substituierten Liganden veranlasste eine Verschiebung des Fokuses auf die bislang übersehene kleine Sub-Bindungstasche neben dem Adeninrest, welche ein Wassermolekül enthält.

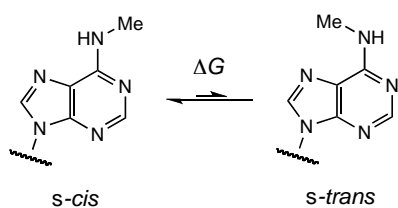


Das Wassermolekül ( $H_2O$ ), lokalisiert in der Nähe des Adenins, befindet sich in einer ungewöhnlichen Umgebung. Es geht zwei Wasserstoffbrücken mit dem Liganden aber keine mit dem Protein ein. Jedoch treten kurze Abstände zu unpolaren Kohlenstoffatomen auf (2.8 and 2.9 Å). Dieses Wassermolekül wurde darum als eine neue, bislang übersehene

Gattung eines Wassermoleküls in der Medizinalchemie klassifiziert: an Liganden gebundenes Wasser. Eine Suche in der PDB zeigte, dass diese Gattung durchaus ubiquitär in Kristallstrukturen, und daher von großer Bedeutung für die Wirkstoffforschung ist. Eine energetisch günstige Verdrängung dieses Wassermoleküls wurde erwartet und daher wurde eine Serie neuer N(6)-alkylierter Bisubstratinhibitoren synthetisiert und evaluiert. Sie zeigten alle eine sehr hohe, ähnliche Affinität gegenüber COMT. Dies kann nicht auf die Hydrophobizität der Liganden zurückgeführt werden, da keine Korrelation zwischen den  $\log D$ - und  $IC_{50}$ - Werten beobachtet wurde. Vier Ko-Kristallstrukturen der Liganden bestätigten eine erfolgreiche Wasserverdrängung durch die N(6)-alkyl Reste. Dies waren die ersten Kristallstrukturen von Liganden ohne Nitrogruppe am Catechol. Allerdings binden die neuen N(6)-alkylierten Liganden in der energetisch ungünstigen *s-trans*-Konformation in die neue Tasche obwohl die *s-cis*-Konformation in Lösung bevorzugt ist.



Das *s-cis* – *s-trans*-Gleichgewicht in Lösung wurde mittels NMR untersucht, dies ergab einen minimalen  $\Delta G_{s-trans \rightarrow s-cis}$ -Wert von  $1.8 \text{ kcal mol}^{-1}$  ( $\Delta G = -RT \ln K$ ;  $K = 95/5$ ) bei



310 K. Trotz der energetischen Unterschiede zwischen den *s-cis* – *s-trans*-Konformeren bilden sowohl die nichtalkylierte Verbindung als auch die N-alkylierten Inhibitoren COMT-Komplexe mit ähnlicher Stabilität.

Der Preis der ungünstigen Konformation muss mit dem energetischen Gewinn, der aus der Wasserverdrängung durch die N(6)-Alkylsubstituenten in der gebundenen *s-trans*-Form resultiert, kompensiert werden. Diese muss daher mindestens einen Beitrag von  $\Delta \Delta G = -1.8 \text{ kcal mol}^{-1}$  als energetisches Limit zur freien Bindungsenthalpie leisten.

Eine einfache Drehung der Seitenkette von Gln120 in Richtung der Enzytoberfläche, induziert durch Inhibitoren mit sterisch anspruchsvollen Resten in Position 6 der Purins, sollte in einer relativ großen, hydrophoben Tasche resultieren. Ein guter Bindungsmodus wurde für 6-Arylpurin-Inhibitoren berechnet. Die biologische Evaluation zeigte jedoch, dass alle

Inhibitoren inaktiv sind. Die Tasche in der Periphery des Adenins toleriert leider keine großen Liganden.

Eine weitere, bislang übersehene Tasche in der Peripherie der bekannten Bindungstasche wurde entdeckt. Es ist eine hydrophobe Vertiefung zwischen dem Riboserest und der Oberfläche des Enzyms, welche in mehreren Kristallstrukturen von COMT konserviert ist. Neue Inhibitoren mit Substituenten an Position 3' der Ribose, welche in die neue Vertiefung binden, wurden synthetisiert und getestet.

Bisubstratinhibitoren mit einem 3'-*p*-Thiocresol-Substituent inhibierten COMT nur schwach ( $IC_{50} = 15 \mu M$ ). Berechnungen deuten darauf hin, dass die Inhibitoren aufgrund ihrer Hydrophobizität in Lösung kollabieren, was in einer verminderten biologischen Aktivität resultiert.

Des Weiteren wurden 3'-*endo*-Fluoro- und 3'-*endo*-Methyl-Inhibitoren hergestellt. Das Fluor azidifiziert die 2'-OH Gruppe und erhöht daher vermutlich die Bindungsstärke der Wasserstoffbrücke zu Glu90. Inhibitoren mit hoher Potenz wurden erhalten, was die Idee stützt, dass ein Fluor-Substituent eine günstige Veränderung der Inhibitoren mit sich bringt. Der Methylsubstituent geht hydrophobe Wechselwirkungen zu Trp, Met und zwei Tyr ein. Inhibitoren mit hoher Potenz wurden erhalten. Ein Methylrest an Position 3' der Ribose repräsentiert auch eine günstige Änderung des Inhibitors. Kristallstrukturen von 3'-Fluoro- und 3'-Methyl-Inhibitoren in COMT zeigten einen nahezu identischen Bindungsmodus in beiden Fällen.

