



Doctoral Thesis

Molecular recognition at the active site of factor Xa

Author(s):

Salonen, Laura Maria

Publication Date:

2011

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006882501> →

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. 19728

Molecular Recognition at the Active Site of Factor Xa

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

Presented by
Laura Maria Salonen

M.Sc., University of Turku, Finland
Born December 3rd, 1980
Citizen of Finland

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. François Diederich, examiner

Prof. Dr. Bernhard Jaun, co-examiner

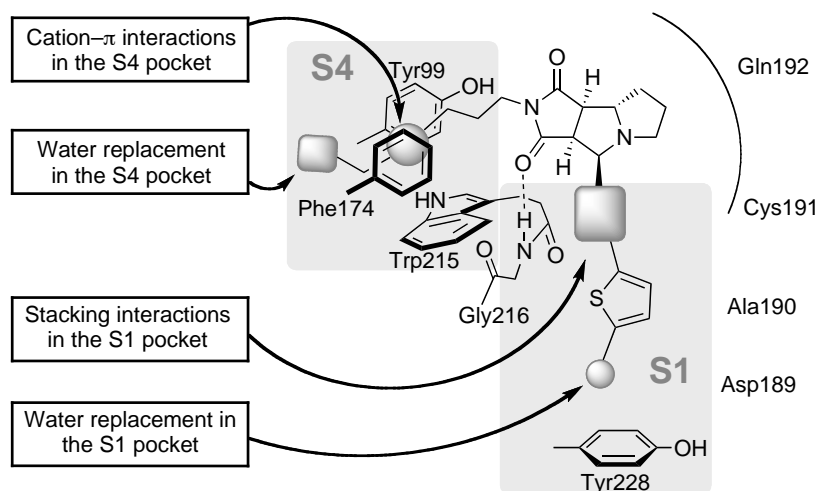
Dr. Wolfgang Haap, co-examiner

Zürich 2011

Summary

Molecular recognition studies are crucial to unravel noncovalent interactions in biological systems. In this thesis, a multidimensional approach was used, comprising structure-based design of enzyme inhibitors and analysis of binding and crystallographic data, to investigate and quantify individual protein–ligand interactions at the molecular level. The in-depth understanding acquired through this approach can ultimately benefit not only drug design, but also other areas of chemical research, such as supramolecular chemistry and catalyst development.

Factor Xa, a central serine protease of the human blood coagulation cascade, has been shown to be an excellent model system for molecular recognition studies, and thus, was selected as a target for our studies. The used inhibitor scaffold features a tricyclic central core, which orients in an L-shaped manner the quaternary ammonium S4 vector and the chlorothiényl-isoxazolyl S1 needle in their respective pockets.



The cation- π interaction in the aromatic S4 pocket, formed by the side chains of Tyr99, Phe174, and Trp215, was quantified by comparing the binding affinities of a trimethylammonium inhibitor ($K_i = 9$ nM) and the corresponding *tert*-butyl inhibitor ($K_i = 550$ nM). The free enthalpy increment for the cation- π interaction originating from the C/N⁺ single-atom mutation was $-\Delta\Delta G = 2.5$ kcal mol⁻¹, corresponding to approximately 0.8 kcal mol⁻¹ per aromatic ring. The X-ray cocrystal structure of the cationic inhibitor bound to factor Xa showed the quaternary ammonium ion residing in the middle of the “aromatic box” of the S4 pocket, and the chlorothiényl moiety interacting with Tyr228 in the S1 pocket.

To determine the influence of *N*-methylation of the terminal amine center on the magnitude of cation– π interactions, inhibitors bearing primary, secondary, and tertiary ammonium moieties were prepared. A dramatic effect of the degree of methylation was found: The binding affinity increased proportionally going from the primary ($K_i = 9800$ nM) to the quaternary ammonium ion ($K_i = 9$ nM), by a factor of 1000 overall, with an average gain in binding free enthalpy of $-\Delta\Delta G = 1.2\text{--}1.8$ kcal mol⁻¹ per methylation. The S4 pocket was also found to tolerate larger ammonium ions than trimethylammonium, such *N*-methylpyrrolidinium and *N*-methylpiperidinium moieties.

The role of the halogen–arene interaction of the thienyl moiety in the S1 pocket was studied by preparing a series of inhibitors bearing differently substituted thienyl residues. The thienyl substituent replaces a conserved water molecule located above Tyr228 in the X-ray crystal structure of factor Xa without a bound ligand. Bromine and chlorine substituents were found to provide inhibitors featuring high binding affinities, whereas incorporating fluorine and iodine resulted in an activity loss by a factor of about five, suggesting that size and polarizability play a significant role in interactions with Tyr228. As compared to the unsubstituted thiophene, chlorine was found to enhance the binding affinity by a factor of 70.

To investigate the stacking interactions of the isoxazolyl moiety with the polarizable walls of the S1 pocket, two inhibitors bearing different oxazole rings were prepared, resulting in a significant loss of binding affinity as compared to the isoxazole inhibitor. The loss of binding affinity is proposed to originate from the interplay of different factors, some of which include the slightly displaced position of the Cl atom of the thienyl moiety with respect to Tyr228, some potentially repulsive contacts between the ligand and the active site, and the suboptimal matching of polar contacts between the oxazole rings and the peptide backbone of the S1 pocket, leading to weakened stacking interactions.

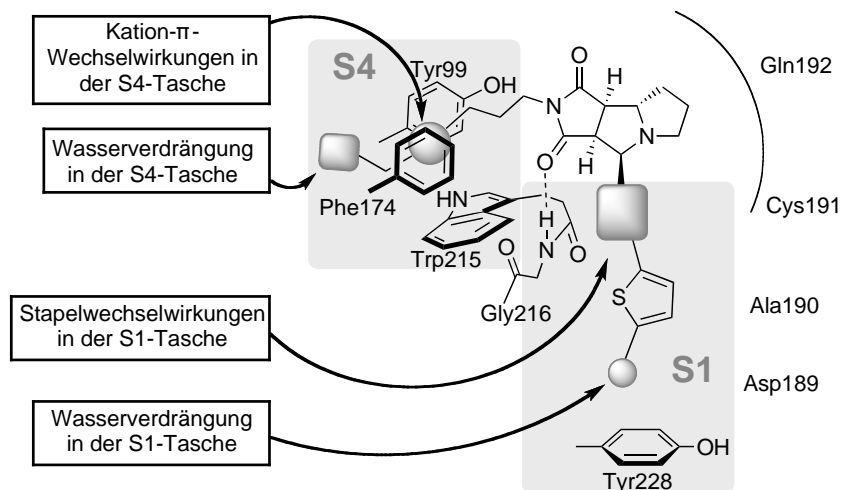
With the aim of replacing a conserved water molecule located at the back of the S4 pocket, the most active factor Xa inhibitor of the Diederich group to date was obtained ($K_i = 2$ nM), featuring a hydroxyethyl pyrrolidinium S4 moiety. In the X-ray cocrystal structure with factor Xa, the inhibitor was found to undergo efficient cation– π interactions in the S4 pocket and, instead of water replacement, water-mediated hydrogen bonding, accounting for the enhancement of binding affinity.

To conclude, the work presented in this thesis shows factor Xa to be an excellent target for molecular recognition studies. Systematic variations of the inhibitor enabled investigations of individual binding interactions. Cation- π interactions in the aromatic box of the S4 pocket were studied in detail, and deeper insight into other noncovalent binding interactions at the active site of factor Xa was gained. In the future, variation of the heteroatoms of the biaryl S1 needle could provide detailed information on optimizing stacking interactions with polar peptide surfaces. In addition, incorporating preorganized S4 moieties on the inhibitor, such as spirocyclic ammonium ions, could provide the optimal geometry for water displacement.

Zusammenfassung

Um nichtkovalente Wechselwirkungen in biologischen Systemen zu entschlüsseln, sind Untersuchungen im Bereich der molekularen Erkennung ausschlaggebend. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde ein multidimensionaler Ansatz verwendet, in dem vom strukturbasierten Design von Enzyminhibitoren Gebrauch gemacht wurde. Die Bindungsaffinität dieser Inhibitoren wurde analysiert und deren Bindungsanordnung in Kristallstrukturen untersucht, um individuelle Protein-Ligand-Wechselwirkungen auf molekularer Ebene zu quantifizieren. Dadurch wurde umfangreiches Wissen erlangt, welches nicht nur die Entwicklung von Inhibitoren, sondern auch andere Bereiche chemischer Forschung, wie die supramolekulare Chemie und die Entwicklung neuer Katalysatoren, bereichern kann.

Für Studien zur molekularen Erkennung stellt die zentrale Serinprotease der menschlichen Blutgerinnungskaskade Faktor Xa ein exzellentes Modellsystem dar und wurde daher als Gegenstand unserer Forschung auserwählt. Das in dieser Arbeit verwendete Inhibitorsystem besteht aus einem trizyklischen Gerüst, welches den quaternären Ammonium-S4-Vektor und die Chlorthienyloxazolyl-S1-Nadel zu deren jeweiligen Taschen ausrichtet.



Die Kation- π -Wechselwirkungen in dem aus den Seitenketten von Tyr99, Phe174 und Trp215 bestehenden Aromaten-Kasten der S4-Tasche wurden durch Vergleich der Bindungsaffinitäten eines Trimethylammoniuminhibitors ($K_i = 9 \text{ nM}$) mit dem entsprechenden *tert*-Butylinhibitor ($K_i = 550 \text{ nM}$) quantifiziert. Aus der C/N⁺-Einzelatommuation ergab sich ein Gewinn an freier Enthalpie von $-\Delta\Delta G = 2.5 \text{ kcal mol}^{-1}$

für die Kation- π -Wechselwirkung, was einem Wert von $\sim 0.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ pro aromatischen Ring entspricht. Die Cokristallstruktur des an Faktor Xa gebundenen kationischen Inhibitors zeigt, dass das quaternäre Ammoniumion im Zentrum des aromatischen S4-Kasten positioniert ist und der Chlorthienylrest mit Tyr228 aus der S1-Tasche wechselwirkt. Um den Einfluss der *N*-Methylierung an der endständigen Aminogruppe auf die Größe der Kation- π -Wechselwirkung zu bestimmen, wurden Inhibitoren mit unterschiedlichem Substitutionsgrad am Aminstickstoff synthetisiert. Es wurde ein substantieller Effekt in Abhängigkeit des Methylierungsgrades gefunden: Die Bindungsaffinität steigt proportional vom primären ($K_i = 9800 \text{ nM}$) zum quaternären Ammoniumion ($K_i = 9 \text{ nM}$) um einen Faktor von 1000, wobei die freie Enthalpie $-\Delta\Delta G$ im Mittel zwischen $1.2\text{--}1.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ pro zusätzlicher Methylgruppe ansteigt. Interessanterweise werden in der S4-Tasche auch größere quaternäre Ammoniumionen als Trimethylammonium, wie *N*-Methylpyrrolidinium und *N*-Methylpiperidinium, toleriert.

Zudem wurde die Bedeutung der Halogen-Aren-Wechselwirkung des Thienylrests in der S1-Tasche anhand einer Inhibitorserie mit unterschiedlich substituierten Thienylresten analysiert. Der erwähnte Thienylsubstituent ersetzt ein über Tyr228 befindliches, strukturelles Wassermolekül, die in der Kristallstruktur von Faktor Xa ohne gebundenen Liganden sich befindet. Dabei konnten mit Brom- und Chlorsubstituenten hohe Bindungsaffinitäten erzielt werden, während Fluor und Iod zu einem Verlust an Aktivität von ca. einem Faktor fünf führten. Dies legt nahe, dass Größe und Polarisierbarkeit maßgeblich die Wechselwirkung mit Tyr228 beeinflussen. Verglichen mit einem unsubstituierten Thiophenrest konnte durch Einführung eines Chlorsubstituenten eine 70fache Erhöhung der Bindungsaffinität erzielt werden.

Um die Stapelwechselwirkungen zwischen der Isoxazoleinheit und den polarisierbaren Wänden der S1-Tasche zu analysieren, wurden zwei Inhibitoren mit unterschiedlichen Oxazolringen hergestellt, die im Vergleich zum Isoxazolsystem einen signifikanten Aktivitätsverlust zeigten. Die verringerte Bindungsaffinität ist auf verschiedene Faktoren zurückzuführen, unter anderem eingeschlossen: Eine geringfügige Verschiebung des Chlorsubstituenten der Thienyleinheit bezüglich Tyr228, potenziell auftretende Abstossungen zwischen den Heteroatomen des Oxazolringes und der aktiven Tasche, sowie ungünstige polare Kontakte zwischen den Oxazolringen und den Peptidrückgrat der S1-Tasche, was zu schwächeren Stapelwechselwirkungen führt.

Mit dem Ziel, das strukturelle Wassermolekül hinter der S4-Tasche zu verdrängen, wurde der aktivste Inhibitor der Diederich-Gruppe ($K_i = 2 \text{ nM}$) mit einem Hydroxyethylpyrrolidinium-S4-Substituenten entworfen. Durch Analyse der Cokristallstruktur stellte sich heraus, dass effiziente Kation- π -Wechselwirkungen in der S4-Tasche eingegangen werden und sich, anstelle der Verdrängung eines Wassermoleküls, eine Wasserstoffbrücke am äusseren Rand der S4-Tasche zu einem Wassermolekül ausbildet, was zur Erhöhung der Bindungsaffinität führt.

Zusammenfassend zeigt sich in dieser Doktorarbeit, dass Faktor Xa ein ausgezeichnetes Enzym für Studien über molekulare Erkennung ist. Die systematische Variation des Inhibitors ermöglichte Untersuchungen individueller Bindungswechselwirkungen. Kation- π -Wechselwirkungen im aromatischen S4-Kasten wurden so im Detail analysiert, und ein tiefergehendes Verständnis der nichtkovalenten Wechselwirkungen im aktiven Zentrum von Faktor Xa wurde erlangt. Eine systematische Variation der Heteroatome des Biaryls der S1-Nadel könnte in Zukunft detaillierte Informationen zur Optimierung von Stapelwechselwirkungen mit polaren Peptidoberflächen liefern. Zusätzlich könnte eine stärkere Präorganisation des in der S4-Tasche bindenden Molekülteils, beispielsweise durch Einbau spirozyklischer Ammoniumionen, zu einer Geometrieoptimierung führen, welche die Verdrängung des Wassermoleküls ermöglichen sollte.