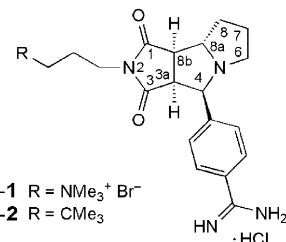


Quantifizierung von Kation- π -Wechselwirkungen in Protein-Ligand-Komplexen: Kristallstrukturanalyse eines Komplexes von Faktor Xa und einem quartären Ammonium-Ion-Liganden**

Kaspar Schärer, Martin Morgenthaler, Ralph Paulini,
Ulrike Obst-Sander, David W. Banner,* Daniel Schlatter,
Jörg Benz, Martine Stihle und François Diederich*

Im Verlauf unserer Studien zur molekularen Erkennung mit dem Ziel einer Quantifizierung des energetischen Beitrages einzelner Protein-Ligand-Wechselwirkungen^[1] richtete sich unser Interesse auf die Erforschung von Kation- π -Wechselwirkungen^[2,3] in der D-Tasche von Thrombin, einer zentralen Serin-Protease in der Blutgerinnungskaskade. Den Boden dieser hydrophoben Tasche bildet der Indol-Rest von Trp215 (Abbildung 1), einer aromatischen Aminosäure-Seitenkette, die in biologischen Systemen häufig Kation- π -Wechselwirkungen eingeht.^[4] Zur Erkundung dieser Wechselwirkung wurden die tricyclischen Inhibitoren (\pm)-**1** und (\pm)-**2** syn-



thesiert,^[5] die entsprechend der Voraussage eines Computer-Modells^[6] beim Binden im aktiven Zentrum von Thrombin ein quartäres Ammonium-Ion bzw. einen ungeladenen *tert*-Butyl-Rest oberhalb des Indol-Ringes von Trp215 positionieren.

[*] Dr. U. Obst-Sander, Dr. D. W. Banner, Dr. D. Schlatter, Dr. J. Benz, M. Stihle

Pharma Division

Präklinische Forschung

F. Hoffmann-La Roche AG, 4070 Basel (Schweiz)

E-mail: david.banner@roche.com

Dr. K. Schärer, M. Morgenthaler, R. Paulini, Prof. Dr. F. Diederich
Laboratorium für Organische Chemie

ETH Hönggerberg

HCI, 8093 Zürich (Schweiz)

Fax: (+41) 1-632-1109

E-mail: diederich@org.chem.ethz.ch

[**] Diese Arbeit wurde durch die ETH Forschungskommission und F. Hoffmann-La Roche, Basel, unterstützt. Wir danken Olivier Kuster, Dr. Thomas Tschopp und Dr. Alain Gast für die Durchführung der biologischen Tests sowie Dr. Michael Hennig für die Unterstützung dieses Projektes.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

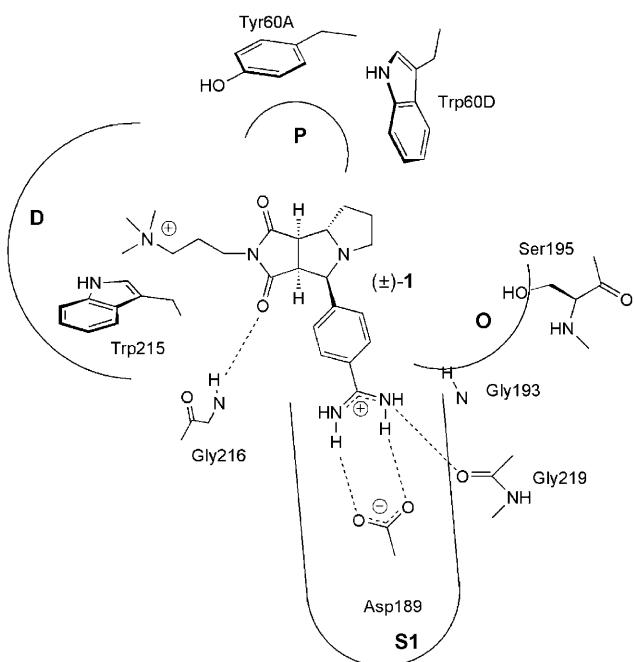
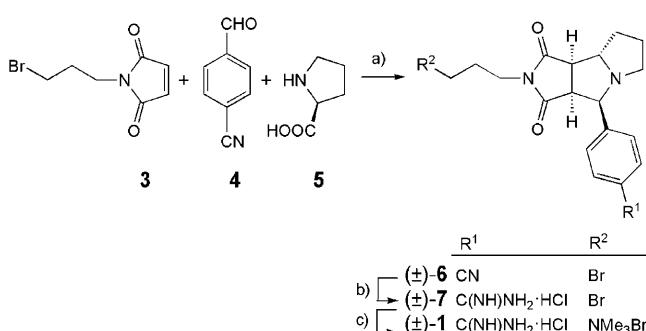


Abbildung 1. Bindung des Inhibitoren (\pm)-1 im aktiven Zentrum von Thrombin. Dem Computer-Modell zufolge bindet nur das 3aS,4R,8aS,8bR-konfigurierte Enantiomer.^[5] Die Referenzverbindung (\pm)-2 sollte gemäß dem Computer-Modell in entsprechender Weise binden.

Ausgangspunkt der Synthese von (\pm)-1 war die 1,3-dipolare Cycloaddition von Maleimid 3, Aldehyd 4 und L-Prolin (5), deren Produkt (\pm)-6 in einer Pinner-Reaktion in das Amidinium-Salz (\pm)-7 überführt wurde (Schema 1, Ex-



Schema 1. Synthese des Inhibitoren (\pm)-1. a) MeCN, 80°C, 32%; b) 1. HCl, MeOH, CHCl₃, 4°C; 2. NH₄Cl, MeOH, H₂O, 65°C, 60%; c) Me₃N, MeOH, RT, 90%.

perimentelles siehe Hintergrundinformationen). Anschließende nucleophile Substitution des Bromids durch Me₃N ergab (\pm)-1. Die Referenzverbindung (\pm)-2 wurde auf ähnliche Weise hergestellt (siehe Hintergrundinformationen).

Die biologischen Aktivitäten der Inhibitoren (\pm)-1 und (\pm)-2 gegen Thrombin, das Verdauungsenzym Trypsin sowie die Serin-Proteasen Faktor VIIa und Faktor Xa wurden entsprechend einer publizierten Vorschrift^[7] gemessen (Tabelle 1).^[8] Faktor VIIa und Faktor Xa sind wie Thrombin Be-

Tabelle 1: Biologische Aktivitäten (Inhibierungs-Konstanten K_i [μM]) der Inhibitoren (\pm)-1 und (\pm)-2.

Inhibitor	K _i [μM]			
	Thrombin	Trypsin	Faktor VIIa	
(\pm)-1	7.76	10.5	> 69 ^[a]	0.28
(\pm)-2	0.13	7.1	> 69 ^[a]	29

[a] Obere Grenze des Assays.

standteile der Blutgerinnungskaskade und sind ebenfalls Zielstrukturen für die Therapie thrombotischer Erkrankungen. Innerhalb der Fehlergrenzen der biologischen Tests wurde keine Hemmung von Faktor VIIa beobachtet; beide Liganden wiesen zugleich eine nur moderate Bindungsaffinität für Trypsin auf. Dagegen unterscheiden sich ihre Affinitäten für Thrombin und Faktor Xa erheblich.

Der Onium-Ion-Inhibitor (\pm)-1 war gegen Thrombin viel weniger aktiv (K_i = 7.76 μM) als die Referenzverbindung (\pm)-2 (K_i = 0.13 μM). Aus Molecular-Modeling-Studien^[6] geht hervor, dass der große Unterschied zwischen den Bindungsaffinitäten (K_i(1)/K_i(2) = 60; die Bindung des tert-Butyl-Inhibitors ist somit um ΔΔG = 2.5 kcal mol⁻¹ energetisch begünstigt) nicht mit unterschiedlichen Bindungsweisen der beiden Imid-N-Substituenten in der hydrophoben D-Tasche erklärt werden kann.^[5] Die Ergebnisse lassen vielmehr darauf schließen, dass die Kation-π-Wechselwirkung zwischen dem Onium-Ion von (\pm)-1 und einem einzigen Indol-Rest (von Trp215) nicht stark genug ist, um die energetischen Verluste der Desolvatation des ionischen Restes bei der Bindung in die D-Tasche des Enzyms auszugleichen. Entsprechende Desolvatisationsverluste sind bei der Bindung eines tert-Butyl-Restes nicht vorhanden, sodass (\pm)-2 eine Affinität aufweist, die der von ähnlichen Inhibitoren entspricht, die große aliphatische Reste in die D-Tasche des Enzyms platzieren.^[9a]

Inhibitor (\pm)-1 weist allerdings eine hohe Aktivität bei der Hemmung von Faktor Xa auf (K_i = 0.28 μM), während jene von (\pm)-2 sehr niedrig ist (K_i = 29 μM). Der Unterschied der Bindungsaffinitäten (K_i(2)/K_i(1) = 100, ΔΔG = 2.8 kcal mol⁻¹) fällt in diesem Fall (Faktor Xa) sogar deutlicher aus als für Thrombin, wobei jetzt die Bindung des Onium-Ions begünstigt wird.^[10] Auch hier entsprechen sich die Bindungsweisen der beiden Inhibitoren im Computer-Modell. Zur genaueren Untersuchung des Ursprungs der starken Onium-Ion-Bindung wurde daher die Kristallstruktur des Komplexes, in dem (\pm)-1 zusammen mit Faktor Xa cokristallisiert wurde, mit einer Auflösung von 1.64 Å gelöst (Abbildung 2).^[11]

In dieser Struktur bindet das 3aS,4R,8aS,8bR-konfigurierte Enantiomer von (\pm)-1 (*ent*-1) in einer ähnlichen Weise in die aktive Tasche von Faktor Xa, wie im Computer-Modell für die verwandte Serin-Protease Thrombin vorausgesagt worden war.^[9b] Der Phenylamidinium-Rest befindet sich in der S1-Tasche und wechselwirkt dort mit der Carboxylat-Seitenkette von Asp189 (d(N···O) = 3.2 und 3.3 Å). Die „untere“ Imid-C=O-Einheit bildet dabei eine H-Brücke zum N-H-Proton von Gly216 im Peptid-Rückgrat (d(O···N) = 3.1 Å). Das tricyclische Gerüst von *ent*-1 besetzt den zentralen Raum im aktiven Zentrum von Faktor Xa (Abbildung 2b).

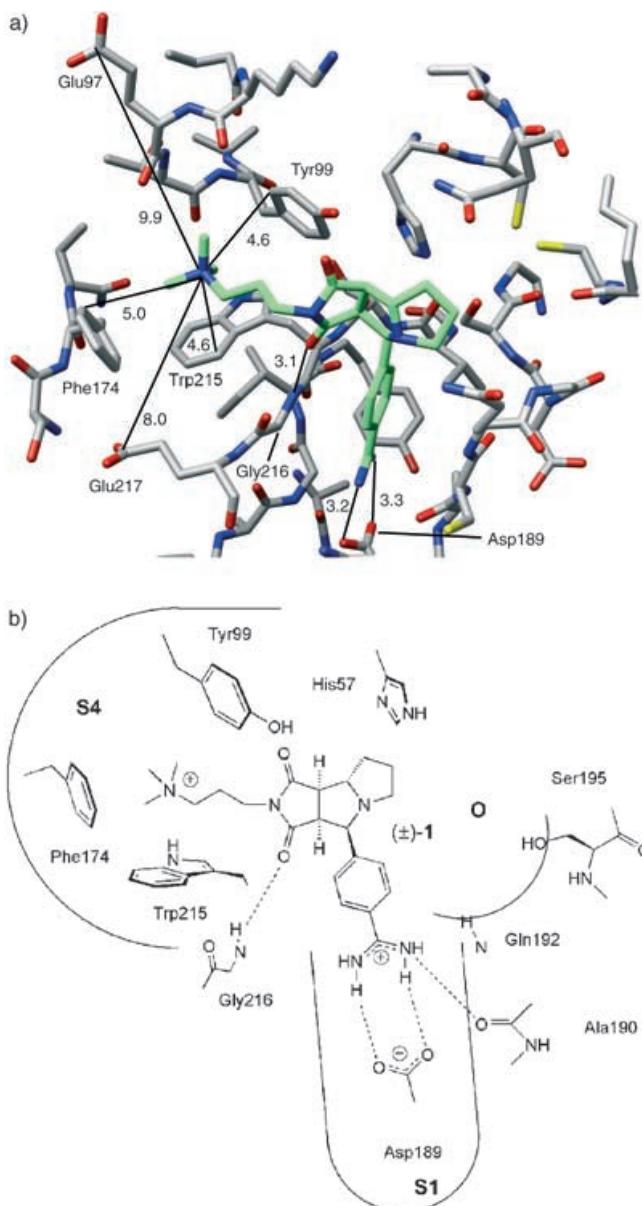


Abbildung 2. a) Inhibitor (3aS,4R,8aS,8bR)-1 im aktiven Zentrum von Faktor Xa gemäß der Kristallstrukturanalyse; rot O, blau N, gelb S, grün C_{Ligand}, grau C_{Protein}. Abstände sind in Å angegeben. Die kleinsten Abstände zwischen den Methyl-C-Atomen des Onium-Ions und den C-Atomen des aromatischen Kastens betragen 3.9 Å (zu Tyr99), 3.9 Å (zu Phe174) und 3.6 Å (zu Trp215). b) Komplex von Faktor Xa mit dem aktiven Enantiomer von (±)-1.

Wie aufgrund der Ergebnisse des Molecular Modeling zu erwarten, bindet das quartäre Ammonium-Ion von *ent*-1 in die S4-Tasche von Faktor Xa, die von Trp215, Tyr99 und Phe174 begrenzt wird. Diese drei Seitenketten bilden einen „aromatischen Kasten“, in dessen Mitte sich das Onium-Ion befindet. Die kleinsten Abstände zwischen N⁺-Zentrum und den nächsten C-Atomen der umgebenden aromatischen Ringe (zwischen 4.6 und 5.0 Å, Abbildung 2a) sind für starke Kation-π-Wechselwirkungen nahezu ideal.

Ein Überblick über die entsprechende Literatur offenbart, dass die S4-Tasche von Faktor Xa tatsächlich schon oft

mit basischen Resten gefüllt wurde; Beispiele sind 4-Amino-substituierte Pyridine, Piperazine, Pyrrolidine, Amidine und Phenylamidine, Imidazole und Imidazoline sowie Benzylamine.^[12] Wir nehmen an, dass die positiv geladenen Reste die Kation-Bindungsstelle im aromatischen Kasten in protonierter Form besetzen. Auch die Einlagerung eines *N,N,N*-Trimethylanilinium-Restes in die S4-Tasche ist schon beschrieben worden.^[13]

In einigen Komplexen bilden die Seitenketten von Glu97 oder Glu217 in Faktor Xa schwache Ionenpaarwechselwirkungen zu Phenylamidinium-Ionen, welche die S4-Tasche besetzen.^[12a,13] Die beiden Carboxylate sind jedoch in den meisten Fällen weit entfernt von der Kation-Bindungsstelle zu finden, wobei sie sich dann eher zum umgebenden Lösungsmittel hin orientieren, wie dies auch im Komplex von Faktor Xa und *ent*-1 der Fall ist ($d(N\cdots CO_2^-)_{Glu97} = 9.9 \text{ \AA}$, $d(N\cdots CO_2^-)_{Glu217} = 8.0 \text{ \AA}$). Coulomb-Wechselwirkungen mit den zwei Carboxylaten sind daher nicht der Grund für die bevorzugte Bindung von kationischen Resten in die S4-Tasche.

Diese Ergebnisse führen zu einer neuen Deutung der besonderen Fähigkeit dieser Tasche, die Bindung basischer Reste zu begünstigen: In ihrer protonierten Form gehen diese Substituenten energetisch vorteilhafte Kation-π-Wechselwirkungen mit dem von Tyr99, Trp215 und Phe174 gebildeten aromatischen Kasten ein. Der Unterschied in freier Bindungsenthalpie von $\Delta\Delta G = 2.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ zugunsten von (±)-1 entspricht dabei einem Durchschnittswert von ca. 0.9 kcal mol⁻¹ pro aromatischen Ring. Dieser Wert stimmt gut mit den in der Literatur berichteten Werten für Kation-π-Wechselwirkungen mit einzelnen aromatischen Ringen überein.^[14] Die hier vorgestellten Ergebnisse für die D-Tasche von Thrombin lassen jedoch trotz des großen Beitrages der freien Enthalpie der Wechselwirkung mit einem einzelnen aromatischen Ring darauf schließen, dass in einem Protein-Ligand-Komplex effiziente Kation-π-Wechselwirkungen nur durch die „Solvatisierung“ des Kations durch mehrere aromatische Ringe erreicht werden können.

Wir nahmen diese Ergebnisse zum Anlass, anhand von Recherchen in der Protein-Datenbank (PDB)^[15] ähnliche Anordnungen aromatischer Ringe für die Komplexierung von Ammonium-Ionen zu identifizieren. Einige Beispiele zur Bindung von quartären Ammonium-Ionen an unterschiedliche Proteine sind in Abbildung 3 dargestellt. So findet sich in Abbildung 3a die schon erwähnte Einlagerung eines Trimethylanilinium-Substituenten in die S4-Tasche von Faktor Xa (PDB-Code: 1LPK).^[13] Die Abstände des Ammonium-N⁺-Zentrums zu den aromatischen Ringen liegen genau in dem Bereich der in unserem Fall gemessenen Abstände. Abbildung 3b zeigt das an Lys27 permethylierte Histon H3 in der Polycomb-Chromodomäne von *Drosophila* (1PFB)^[16] und Abbildung 3c ein N,N-dimethyliertes Prolin in dem periplasmatischen Liganden-bindenden Protein ProX aus *E. coli* (1R9Q).^[17] Jeweils mindestens eine der drei Seitenketten, welche die aromatischen Kästen in Abbildung 3a-c bilden, gehört zu einem Tryptophan. Das kationische Zentrum befindet sich dabei immer in der Nähe der Normalen durch die Zentroide der aromatischen Ringe, was eine optimale Wechselwirkung mit dem aromatischen π-System ermöglicht.

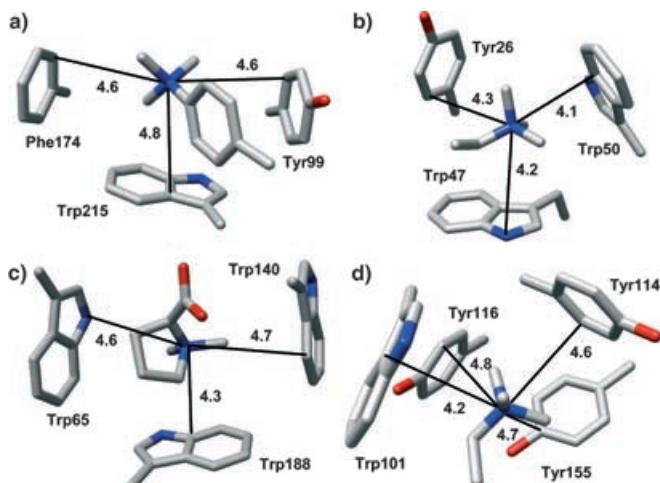


Abbildung 3. Durch PDB-Recherchen gefundene Beispiele von quartären Ammonium-Ionen, die in der S4-Tasche von Faktor Xa (a) oder in ähnlichen aromatischen Kästen in anderen Proteinen gebunden sind (b-d); rot O, blau N, grau C. Die kürzesten Ligand-Protein-Abstände sind in Å angegeben. PDB-Codes: a) 1LPK, b) 1PFB, c) 1R9Q, d) 1LN3.

Abbildung 3d zeigt einen aromatischen Kasten aus vier aromatischen Seitenketten eines Komplexes des menschlichen Phosphatidylcholin-Transfer-Proteins mit dem Cholin-Teil des entsprechenden Substrates (1LN3).^[18] Ähnlich wie bei den vorigen Strukturen liegt das kationische Zentrum in diesem Beispiel in der unmittelbaren Nähe der Normalen durch die Zentroide der aromatischen Ringe von Trp101 und Tyr155; dagegen sind die Ringebenen von Tyr114 und Tyr116 leicht gedreht, sodass das Kation nicht mehr auf der Ebenen-Normalen durch den Ringzentroid liegt. Der Verlust an Wechselwirkungsenergie durch die gedrehte Stellung der zwei aromatischen Ringe wird anscheinend in diesem Beispiel durch die Beteiligung eines vierten Arenringes kompensiert. Bei allen in Abbildung 3 gezeigten Strukturen liegen die kleinsten Abstände zwischen N⁺-Zentrum und aromatischen Seitenketten ($d(N^+ \cdots C_{\text{arom}})$) innerhalb von 4–5 Å, sodass dieser Abstandsbereich für Wechselwirkungen zwischen quartären Ammonium-Ionen und π-Systemen optimal zu sein scheint. Weitere Beispiele von quartären Ammonium-Ionen in aromatischen Kästen finden sich in den Abbildungen 5–9SI in den Hintergrundinformationen.

Die PDB-Recherche wurde anschließend auf protonierte tertiäre Ammonium-Ionen innerhalb aromatischer Kästen von Proteinen ausgedehnt (Abbildung 4). Auch hier befinden sich die Kationen in unmittelbarer Nähe der Ebenen-Normalen durch die Zentroide der aromatischen Ringe. Interessanterweise wird in diesen Fällen zusätzlich zu den Kation-π-Wechselwirkungen an der offenen Seite des aromatischen Kastens eine H-Brücke zwischen R₃NH⁺ und Acceptorzentren von Aminosäure-Seitenketten beobachtet, die den Komplex weiter stabilisiert; diese H-Brücke wird manchmal auch über ein H₂O-Molekül vermittelt. Beispiele hierfür sind die Strukturen eines (protonierten) tertiären Amin-Hemmers im Komplex mit Oxidosqualen-Cyclase (Abbildung 4a; 1H37),^[19] der Komplex eines protonierten N,N-dimethylierten Lysin-Restes eines Histons in der HP1-Chromodomäne

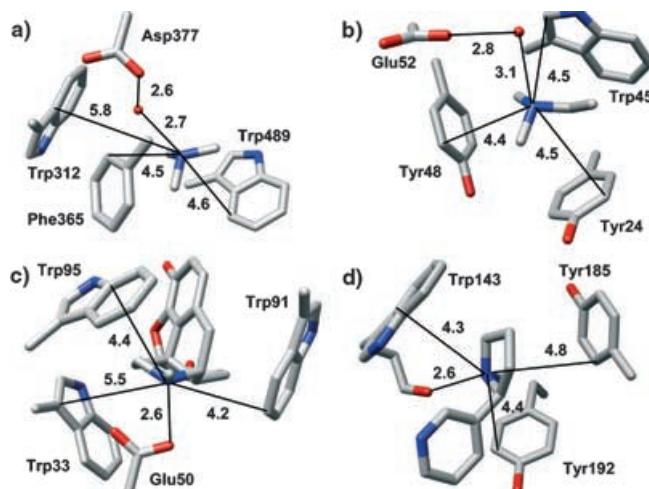


Abbildung 4. Beispiele von Treffern der PDB-Recherche, in denen ein protoniertes tertiäres Ammonium-Ion in einem aromatischen Kasten gebunden wird; rot O, blau N, grau C. Die kleinsten Abstände zwischen Ligand und Protein sind in Å angegeben. PDB-Codes: a) 1H37, b) 1KNA, c) 1Q0Y, d) 1UW6.

von *Drosophila* (Abbildung 4b; 1KNA),^[20] der Komplex von Morphin mit dem Antikörper 9B1 (Abbildung 4c; 1Q0Y)^[21] sowie der Komplex von Nicotin mit einem nicotinischen Ach-Rezeptor (Abbildung 4d; 1UW6).^[22] In entsprechender Weise wechselwirken manche der protonierten Onium-Ionen in der S4-Tasche von Faktor Xa nicht nur mit dem aromatischen Kasten, sondern bilden auch H-Brücken zu benachbarten polaren Aminosäureresten oder H₂O-Molekülen.^[12a,f] Interessanterweise werden protonierte sekundäre Ammonium-Ionen, wahrscheinlich wegen zu hoher Desolvatisationskosten, nicht in solchen Anordnungen gefunden.

Kation-π-Wechselwirkungen werden auch in den Kristallpackungen kleiner Moleküle beobachtet, obwohl hier sterische Faktoren und die Tendenz zu einer möglichst dichten Kristallpackung die Bildung von aromatischen Kästen nicht zulassen. Eine Cambridge-Structural-Database-(CSD)-Suche nach kleinen Abständen zwischen Tetraalkylammonium-Ionen und Arenen lieferte 22 Beispiele, von denen sieben einen zweiten engen Kontakt zu einem weiteren aromatischen Substituenten aufwiesen.^[23] Analog zu den Proteinbeispielen befanden sich die Kationen in unmittelbarer Nähe der π-Ebenen-Normalen durch die Zentroide der aromatischen Ringe. Ausgewählte Beispiele sind in Abbildung 10SI in den Hintergrundinformationen zu finden.

Anhand von biologischen Bindungsdaten und Protein-kristallographischen Ergebnissen wurde hier gezeigt, dass der von den Seitenketten von Phe174, Tyr99 und Trp215 gebildete aromatische Kasten in der S4-Tasche von Faktor Xa eine hochwirksame Onium-Bindungsstelle ist. Durch Vergleich der Bindungsaffinitäten des quartären Ammonium-Ion-Liganden (\pm)-1 mit dem *tert*-Butyl-Derivat (\pm)-2 konnte der Beitrag der Kation-π-Wechselwirkungen zur freien Bindungsenthalpie in diesem Kasten zu $\Delta\Delta G = 2.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ ermittelt werden. Aus PDB-Recherchen wird die Allgemeingültigkeit derartiger Kation-Bindungskästen in biologischen Systemen offensichtlich – die bei diesen Untersuchungen

gewonnenen Erkenntnisse dürften daher hilfreich für das Design und die Optimierung von Leitstrukturen sein.

Eingegangen am 9. März 2005
Online veröffentlicht am 13. Juni 2005

Stichwörter: Faktor Xa · Inhibitoren · Kation- π -Wechselwirkungen · Molekulare Erkennung · Thrombin

- [1] F. Hof, F. Diederich, *Chem. Commun.* **2004**, 477–480.
- [2] a) N. Zacharias, D. A. Dougherty, *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, 23, 281–287; b) J. C. Ma, D. A. Dougherty, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1303–1324; c) D. A. Dougherty, *Science* **1996**, 271, 163–168; d) D. A. Dougherty, D. A. Stauffer, *Science* **1990**, 250, 1558–1560.
- [3] Ein neuerer Übersichtsartikel: E. A. Meyer, R. K. Castellano, F. Diederich, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 1244–1287; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 1210–1250.
- [4] P. Gallivan, D. A. Dougherty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 9459–9464.
- [5] Mitglieder dieser Inhibitor-Klasse binden in nahezu identischen Konformationen an das strukturell gut definierte aktive Zentrum von Thrombin: a) K. Schärer, M. Morgenthaler, P. Seiler, F. Diederich, *Helv. Chim. Acta* **2004**, 87, 2517–2538; b) J. A. Olsen, D. W. Banner, P. Seiler, U. Obst-Sander, A. D'Arcy, M. Stihle, K. Müller, F. Diederich, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 2611–2615; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 2507–2511; c) U. Obst, D. W. Banner, L. Weber, F. Diederich, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 287–295.
- [6] a) P. R. Gerber, K. Müller, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1995**, 9, 252–268; b) Gerber Molecular Design (<http://www.moloc.ch>).
- [7] Thrombin: K. Hilpert, J. Ackermann, D. W. Banner, A. Gast, K. Gubernator, P. Hadvary, L. Labler, K. Müller, G. Schmid, T. B. Tschoch, H. van de Waterbeemd, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 3889–3901. Faktor Xa: Kinetischer Enzymhemmungs-Test, bei dem ein chromogenes Substrat (S) [$S-2222 K_m = 316 \mu\text{M}$] bei einer Konzentration von 200 μM der Einwirkung von menschlichem Faktor Xa bei Raumtemperatur in einem Puffer bei pH 7.8 [HEPES 100 mM, NaCl 140 mM, PEG 6000 0.1%, Tween 80 0.2%] oder unterschiedlichen Inhibitor-Konzentrationen ausgesetzt wird. Der K_i -Wert wird aus dem IC_{50} -Wert berechnet [$K_i = IC_{50}/(1+(S/K_m))$], der graphisch aus einer Konzentrations-Aktivität-Kurve des Inhibitors bestimmt wird.
- [8] E. W. Davie, K. Fujikawa, W. Kisiel, *Biochemistry* **1991**, 30, 10363–10370.
- [9] a) U. Obst, P. Betschmann, C. Lerner, P. Seiler, F. Diederich, V. Gramlich, L. Weber, D. W. Banner, P. Schönholzer, *Helv. Chim. Acta* **2000**, 83, 855–909; b) nur das ent-1-Enantiomer mit derselben absoluten Konfiguration, die auch für die Bindung an Thrombin notwendig ist, wird von Faktor Xa gebunden. Untersuchungen zu enantiomerenreinen tricyclischen Thrombin-Inhibitoren finden sich unter Lit. [5a] und [5c].
- [10] D. Monnaie, D. Arosio, N. Griffon, T. Rose, A. R. Rezaie, E. Di Cera, *Biochemistry* **2000**, 39, 5349–5354.
- [11] Angaben zur Proteinexpression und -reinigung finden sich in den Hintergrundinformationen. Kristallisation und Strukturbestimmung: Eine Lösung von 15 mg mL⁻¹ „short-form“ Faktor Xa wurde vor der Kristallisation über Nacht zusammen mit dem Liganden (3.8 mM) inkubiert. Der Protein-Ligand-Komplex wurde mit dem gleichen Volumen Kristallisationspuffer (0.2 M NH₄OAc, 0.1 M Bis-Tris pH 5.5, und 25% PEG 3350) im Microbatch-Modus gemischt. Nach einer Woche bildeten sich Kristalle, die innerhalb von zwei Wochen zu voller Größe anwuchsen. Vor der Datenaufnahme wurden die Kristalle in einen Kristallisationspuffer mit 20% Glycerin überführt und in flüssigem N₂ schockgefroren. Die Messung der Beugungsdaten wurde mit Hilfe eines Bruker-FR591-Röntgengenerators (50 kV/60 mA) durchgeführt, der mit einem Osmic-Fokussierungs-Monochromator (0.2 mm) und einem Oxford-Cryostream-Kühler (gemessen wurde bei 100 K) ausgestattet war. Der Marresearch345 (dtb) Image-Plate-Detektor wurde in einer Entfernung von 110 mm von dem Kristall positioniert und mit einer Pixelgröße von 0.15 mm abgetastet. Die Expositionszeiten betrugen 600 s bei 0.5° Frames. Die Daten von 262 Frames wurden bis zu einer Auflösung von 1.62 Å unter Verwendung von XDS (W. Kabsch, *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, 26, 795–800) verarbeitet. Die Raumgruppe ist $P2_12_1$ mit den Elementarzellen-Dimensionen $a = 48.84$, $b = 71.67$ und $c = 72.75 \text{ \AA}$. 163433 gemessene Reflexe wurden auf 32725 unabhängige Reflexe reduziert; der R -Faktor betrug 6.1% (37.4% in der äußersten Schale, 1.62–1.71 Å), bei 98.7% (97.1%) des theoretischen Datensatzes mit I/σ 15.5 (4.3). Für die Datenreduktion wurde das CCP4-Software-Paket verwendet (The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1994**, 50, 760–763). Die Struktur wurde durch molecular replacement gelöst, wobei 1c5m.pdb als Modell verwendet wurde. Modell-Aufbau mit Moloc^[6] und Verfeinerung mit Refmac5 (G. N. Murshudov, A. A. Vagin, E. J. Dodson, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1997**, 53, 240–255) bis zu einer Auflösung von 1.64 Å ergaben die endgültigen kristallographischen R -Faktoren von 20.4% (beobachtet) und 23.7% (gesamt), mit Werten in der äußeren Schale (1.64–1.68 Å) von 28.6 und 29.7%, für 2421 Atome, die ein Na⁺-Ion und 276 H₂O-Moleküle mit einschließen. Die Elektronendichte des Inhibitors ist sehr klar. Die Koordinaten wurden in der Protein-Datenbank abgelegt, PDB-Code: 2bok.
- [12] Eine Auswahl an Kristallstrukturen: a) S. Maignan, J.-P. Guilloteau, Y. M. Choi-Sledeski, M. R. Becker, W. R. Ewing, H. W. Pauls, A. P. Spada, V. Mikol, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 685–690 (PDB-Codes: 1NFU, 1NFW, 1NFX, 1NFY); b) H. Nishida, Y. Miyazaki, T. Mukaihira, F. Saitoh, M. Fukui, K. Harada, M. Itoh, A. Muraoka, T. Matsusue, A. Okamoto, Y. Hosaka, M. Matsumoto, S. Ohnishi, H. Mochizuki, *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, 50, 1187–1194 (PDB-Codes: 1IQE, 1IQF, 1IQG, 1IQH, 1IQI, 1IQJ, 1IQK, 1IQL, 1IQM, 1IQN); c) S. Maignan, J.-P. Guilloteau, S. Pouzieux, Y. M. Choi-Sledeski, M. R. Becker, S. I. Klein, W. R. Ewing, H. W. Pauls, A. P. Spada, V. Mikol, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3226–3232 (PDB-Codes: 1F0R, 1F0S, 1EZQ); d) M. Adler, D. D. Davey, G. B. Phillips, S.-H. Kim, J. Jancarik, G. Rumennik, D. R. Light, M. Whitlow, *Biochemistry* **2000**, 39, 12534–12542 (PDB-Code: 1FJS); e) K. Kamata, H. Kawamoto, T. Honma, T. Iwama, S.-H. Kim, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 6630–6635 (PDB-Code: 1XKA); f) H. Brandstetter, A. Kühne, W. Bode, R. Huber, W. von der Saal, K. Wirthensohn, R. A. Engh, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 29988–29992 (PDB-Code: 1FAX). g) Ein in die D-Tasche (Thrombin) bzw. S4-Tasche (Faktor Xa) eingelagerter, positiv geladener Substituent soll nach Voraussagen einer computergestützten GRID/CPCA-Analyse der entsprechenden aktiven Zentren der Enzyme die Selektivität eines Inhibitors für Faktor Xa im Vergleich zu Thrombin erhöhen. Im Unterschied zu den Voraussagen der computergestützten Studie legen die Ergebnisse der biologischen Aktivitäten für $(\pm)\text{-}2$ nahe, dass die analoge Einführung von ungeladenen hydrophoben Substituenten eher selektive Thrombin- als Faktor-Xa-Inhibitoren ergibt; M. A. Kastenholz, M. Pastor, G. Cruciani, T. Fox, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3033–3044.
- [13] H. Matter, E. Defossa, U. Heinelt, P.-M. Blohm, D. Schneider, A. Müller, S. Herok, H. Schreuder, A. Liesum, V. Brachvogel, P. Lönze, A. Walser, F. Al-Obeidi, P. Wildgoose, *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 2749–2769 (PDB-Codes: 1LPG, 1LPK).
- [14] Angaben zum energetischen Beitrag von Kation- π -Wechselwirkungen finden sich in: a) Lit. [2–4]; b) D. L. Beene, G. S. Brandt, W. Zhong, N. M. Zacharias, H. A. Lester, D. A. Dougherty, *Biochemistry* **2002**, 41, 10262–10269.

- [15] a) M. Hendlich, A. Bergner, J. Günther, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 607–620; b) J. Günther, A. Bergner, M. Hendlich, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 621–636. Für die Durchführung der PDB-Recherchen wurde Relibase 1.2.1 (März 2003) verwendet. Dabei wurden alle Datenbank-Einträge, die entweder ein quartäres Ammonium-Ion (263 Strukturen) oder eine tertiäre (1024 Strukturen) oder sekundäre (1594 Strukturen) Amino-Funktion innerhalb des Liganden enthielten, zusammen mit den zugehörigen aktiven Zentren heruntergeladen und durchgesehen. Die graphischen Darstellungen wurden mithilfe des Software-Paketes UCSF Chimera vom Computer Graphics Laboratory, University of California, San Francisco, (unterstützt durch NIH P41RR-01081) erstellt. <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>; E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin, *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612.
- [16] J. Min, Y. Zhang, R.-M. Xu, *Genes Dev.* **2003**, *17*, 1823–1828. PDB-Code: 1PFB.
- [17] A. Schiefner, J. Breed, L. Bösser, S. Kneipl, J. Gade, G. Holtmann, K. Diederichs, W. Welte, E. Bremer, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 5588–5596. PDB-Code: 1R9Q.
- [18] S. L. Roderick, W. W. Chan, D. S. Agate, L. R. Olsen, M. W. Vetting, K. R. Rajashankar, D. E. Cohen, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 507–511. PDB-Code: 1LN3.
- [19] A. Lenhart, D. J. Reinert, J. D. Aebi, H. Dehmlow, O. H. Morand, G. E. Schulz, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2083–2092. PDB-Code: 1H37.
- [20] S. A. Jacobs, S. Khorasanizadeh, *Science* **2002**, *295*, 2080–2083. PDB-Code: 1KNA.
- [21] E. Pozharski, M. A. Wilson, A. Hewagama, A. B. Shanafelt, G. Petsko, D. Ringe, *J. Mol. Biol.* **2004**, *337*, 691–697. PDB-Code: 1Q0Y.
- [22] P. H. N. Celie, S. E. van Rossum-Fikkert, W. J. van Dijk, K. Brejc, A. B. Smit, T. K. Sixma, *Neuron* **2004**, *41*, 907–914. PDB-Code: 1UW6.
- [23] F. H. Allen, *Acta Crystallogr. Sect. B* **2002**, *58*, 380–388. Die CSD-Recherche wurde unter Verwendung einer Ausschlussgrenze für den Abstand d zwischen dem Ammonium-N-Atom und dem Zentroid des aromatischen Ringes von $3.5 \text{ \AA} < d < 5.5 \text{ \AA}$ durchgeführt. Es wurden nur fehlerfreie Strukturen berücksichtigt; partiell ungeordnete Strukturen, Polymere, Pulversstrukturen sowie metallorganische Verbindungen wurden ausgeschlossen.