

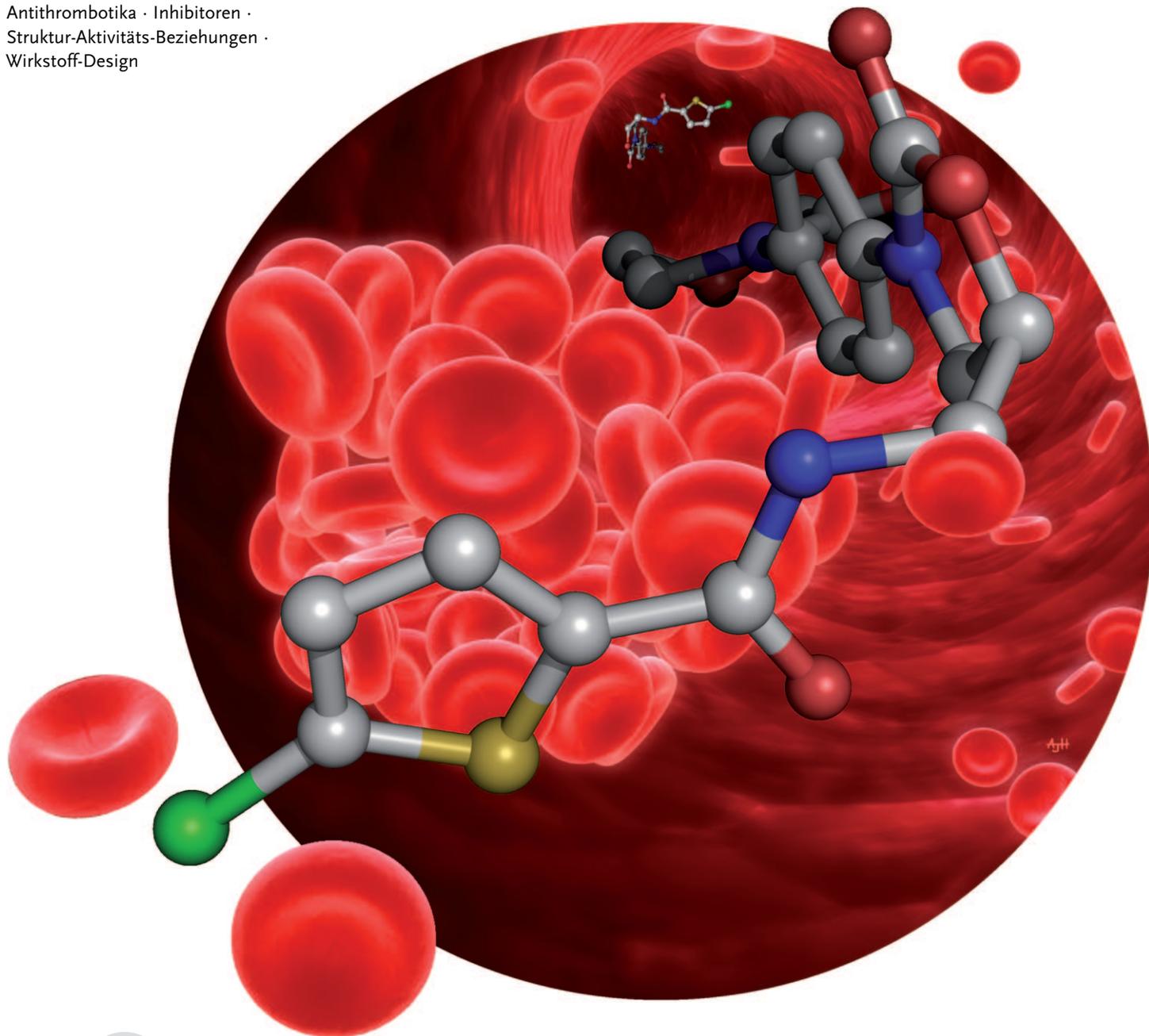
Orale, direkte Thrombin- und Faktor-Xa-Hemmer: Kommt die Ablösung für Warfarin, Blutegel und Schweinedärme?

Alexander Straub,* Susanne Roehrig und Alexander Hillisch

Stichwörter:

Antithrombotika · Inhibitoren ·
Struktur-Aktivitäts-Beziehungen ·
Wirkstoff-Design

Herrn Professor Franz Effenberger gewidmet



Bislang müssen sich Patienten zur Vorbeugung von Thrombosen nach Operationen täglich Heparin spritzen oder müssen zur Schlaganfallprophylaxe bei Vorhofflimmern Vitamin-K-Antagonisten vom Cumarintyp einnehmen, die eine geringe therapeutische Breite haben und deren Dosierung regelmäßig überwacht werden muss. Um den Therapiestandard bei thromboembolischen Erkrankungen, wie tiefen Venenthrombosen, Lungenembolien und Hirnschlag bei Vorhofflimmern, zu verbessern, wurde in der letzten Dekade intensiv an neuen, oral wirksamen Thrombin- und Faktor-Xa-Inhibitoren geforscht. Einige dieser Verbindungen sind bereits auf dem Markt oder befinden sich in fortgeschrittener klinischer Entwicklung; sie könnten den Antikoagulantienmarkt revolutionieren.

1. Einleitung

Die Blutstillung (Hämostase) ist ein komplexer Mechanismus, der nach einer Gewebsverletzung den Organismus vor lebensbedrohlichem Blutverlust schützt. Sie wird über zwei Wege aktiviert:

In der primären (zellulären) Hämostase kommt es nach einer arteriellen Gefäßwandverletzung, die auch arteriosklerotische Ursachen haben kann, zur Freisetzung des Von-Willebrand-Faktors, der an Thrombozyten bindet und so eine Thrombozytenaggregation und die Bildung eines Thrombus auslösen kann. Diesen Ablauf kann man durch Einsatz von Thrombozyten-Aggregationshemmern unterbrechen. Eingesetzt werden hierfür z.B. P2Y12-Rezeptorantagonisten wie Clopidogrel und Cyclooxygenase-Inhibitoren wie Acetylsalicylsäure (ASS), welche die Bildung des proaggregatorischen Thromboxan A2 hemmt.

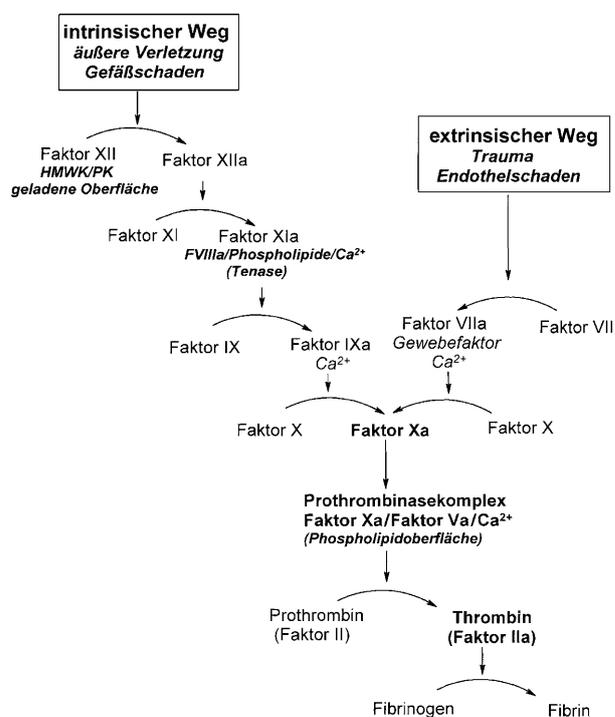
Die sekundäre plasmatische Hämostase stößt die Blutgerinnungskaskade an (Schema 1), mit dem Ziel, das Plättchenaggregat durch Fibrinvernetzung zu stabilisieren. Sie setzt insbesondere auch dann ein, wenn es infolge von Operationen, Immobilisierung oder Vorhofflimmern zu einem verlangsamten Blutfluss kommt. Entstehende Scherkräfte und das Vorherrschen hypoxischer Bedingungen führen zur Bildung von Gewebefaktoren.

Der intrinsische Kontaktaktivierungsweg beginnt mit der Bildung eines primären Komplexes aus HMWK (High Molecular Weight Kininogen), Präkallikrein (PK) und Faktor XII (FXII). Durch die Wechselwirkung mit Kollagen oder anderen, negativ geladenen Oberflächen (z.B. bei äußeren Verletzungen am Gefäßendothel, Lipoproteine bei Hyperlipidämie, Bakterien bei Infektionen) wird FXII zu FXIIa aktiviert. FXIIa spaltet FXI zu FXIa, der wiederum im Komplex mit FVIIIa und Phospholipiden (Tenasekomplex) FIX in FIXa und dieser FX in FXa überführt.

Der extrinsische Weg (Gewebefaktorweg) wird bei einer Verletzung ohne direkten Kontakt zu unphysiologischen Oberflächen, einer Endothelschädigung oder durch Hypoxie infolge verlangsamten Blutflusses aktiviert.^[1] Hierbei wird aus dem geschädigten Gewebe der Gewebefaktor (TF, Thromboplastin, FIII), ein Oberflächenmembranglycoprotein, präsentiert und bindet zirkulierenden Faktor VIIa und

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	4671
2. Strukturvergleich und Substrateigenschaften von Thrombin und Faktor Xa	4673
3. Thrombin-Inhibitoren	4675
4. Faktor-Xa-Inhibitoren	4678
5. Duale Thrombin/Faktor-Xa-Inhibitoren	4682
6. Vergleichende Betrachtung der Wirkstoffentwicklungen von FIIa- und von FXa-Inhibitoren	4684



Schema 1. Die Blutgerinnungskaskade.

VII, was die Umwandlung von FVII in FVIIa erleichtert. Der Komplex aus FVIIa, TF, Calcium und Phospholipiden katalysiert die Umwandlung von FX in FXa. Es wurde gezeigt, dass die Plasmakonzentration von TF auch bei Vorhofflimmern erhöht ist.^[2]

[*] Dr. A. Straub, Dr. S. Roehrig, Prof. Dr. A. Hillisch
Bayer HealthCare Pharmaceuticals, Medicinal Chemistry Wuppertal
42096 Wuppertal (Deutschland)
E-Mail: alexander.straub@bayer.com

In Faktor Xa (FXa) laufen also intrinsischer und extrinsischer Weg zusammen. FXa ist in freier Form nur schwach aktiv. Er wird durch Bildung des Prothrombinasekomplexes aus FXa, Kofaktor Va und Calciumionen auf Phospholipidoberflächen von Thrombozyten stark aktiviert. In dieser Form spaltet er Prothrombin zu Thrombin. Dieser Schritt bedeutet eine etwa 1000-fache Verstärkung. Thrombin spaltet die Fibrinopeptide A und B von Fibrinogen ab, wobei die so entstandenen Fibrinmonomere durch den ebenfalls von Thrombin aktivierten FXIII (einer Transglutaminase) vernetzt werden.

Thrombin fördert die Aktivierung der Gerinnungsfaktoren FXI, FIX, FX, FXIII sowie der Kofaktoren FV und FVIII und amplifiziert dadurch seine eigene Bildung. Höhere Konzentrationen an Thrombin aktivieren zusammen mit Thrombomodulin den Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI). TAFI spaltet die C-terminalen Lys- und Arg-Reste des Fibrins ab. Da dies die Andockstelle für das fibrinolytische Plasminogen ist, kann sich der Ternärkomplex aus Plasminogen und tPA (Tissue Plasminogen Activator) auf der Fibrinoberfläche nicht mehr bilden, und es kommt zu einer Herabregulation der Plasminogenaktivierung und dadurch der Fibrinolyse. Thrombin aktiviert außerdem die Protease-aktivierbaren Rezeptoren (PAR) auf der Oberfläche von Blutplättchen, die dadurch zur Aggregation stimuliert werden und so die zweite wichtige Komponente von Blutgerinnseln liefern. Thrombin löst auf vaskulären Glattmuskulzellen Proliferations- und Migrationsprozesse aus, die für arteriosklerotische Prozesse von Bedeutung sind.

Überschüssiges Thrombin, das außerhalb des Bereichs der Läsion zirkuliert, wird auf intakten Endothelzelloberflächen vom Membranprotein Thrombomodulin gebunden. Der entstehende Komplex zeigt keine prokoagulierende Wirkung mehr, sondern bewirkt stattdessen die Aktivierung der Serinprotease Protein C. Zusammen mit dem Kofaktor Protein S hat aktiviertes Protein C koagulationshemmende Eigenschaften, indem es die Phospholipid-gebundenen Faktoren Va und VIIIa abbaut. Hierdurch wird die Wirkung von Thrombin auf den Bereich der Gefäßverletzung beschränkt, das aktivierte Gerinnungssystem moderiert und eine systemische Wirkung vermieden.

Dies alles lässt ein unterschiedliches pharmakologisches Profil bei FXa- und Thrombin-Inhibitoren erwarten. Bei einer FXa-Inhibition wird zwar die Neusynthese von

Thrombin gehemmt, bereits zirkulierendes Thrombin kann aber nur von Thrombin-Inhibitoren beeinflusst werden.

Thrombin und Faktor Xa werden im Körper durch Antithrombin (AT) inhibiert. Durch Heparin, ein zur industriellen Herstellung aus Schweinedarm oder Rinderlunge isoliertes, sulfatiertes Glycosaminoglycan, wird AT allosterisch stark aktiviert. Die eigentliche physiologische Funktion des Heparins wird jedoch in der Bakterienabwehr von Mastzellen vermutet. Aus Heparin können durch Fragmentierung und Fraktionierung niedermolekulare Heparine (LMWH) wie Enoxaparin erhalten werden, die günstigere pharmakokinetische Eigenschaften aufweisen, weniger Nebenwirkungen hervorrufen und eine selektivere Wirkung gegen FXa haben. Diese intravenös oder subkutan zu verabreichenden Stoffe werden heute routinemäßig in der Klinik eingesetzt, sind aber nach wie vor tierischen Ursprungs und können daher verunreinigt sein. Eine als Methylglycosid stabilisierte, vollsynthetische Pentasaccharidteilsequenz des Heparins hemmt im Komplex mit AT nur noch den Faktor Xa, hat eine lange Halbwertszeit und wird als Fondaparinux in der Klinik nach größeren orthopädischen Operationen eingesetzt.^[3] Der Prothrombinasekomplex selbst ist aber keiner Hemmung durch den AT-gebundenen indirekten FXa-Inhibitor mehr zugänglich.^[4] Direkte FXa-Inhibitoren haben hier den Vorteil, auch den Prothrombinasekomplex zu inhibieren.

Indirekte (d.h. über AT vermittelt wirkende) FXa-Inhibitoren werden oral nicht resorbiert und müssen daher subkutan gespritzt werden. Während dies für eine kurze Zeit im Krankenhaus noch akzeptabel sein mag, muss der Patient bei einer länger notwendigen Therapie wie der Schlaganfallprophylaxe bei Vorhofflimmern über ein orales Antikoagulans verfügen können.

Hierfür werden bislang Vitamin-K-Antagonisten wie Warfarin und andere Cumarinderivate eingesetzt. Vitamin K ist als Kofaktor an der Glutamatarboxylierung der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X beteiligt, die wegen der Calcium-bindenden Eigenschaften der so entstandenen Malonyleinheit mit den zusätzlichen Carboxylatgruppen für die biologische Aktivität dieser Faktoren essenziell ist.

Durch die schmale therapeutische Breite, die durch genetische Polymorphismen der metabolisierenden Enzyme sowie durch die kovalente Bindung der Cumarine an der Vitamin-K-Epoxid-Reduktase mitverursacht wird, fallen bei dieser Therapie erhebliche Kosten aufgrund von Nebenwir-



Alexander Straub, geboren 1959, studierte Chemie in Stuttgart, promovierte 1989 bei Prof. F. Effenberger und trat anschließend als Medizinalchemiker in die Pharmaforschung der Bayer AG ein. Nach zehn Jahren wechselte er für acht Jahre zu Bayer Crop-Science, wo er sich in der Verfahrensforschung und Verfahrensentwicklung mit chemischen Produktionsverfahren beschäftigte. Seit 2008 ist er als Principal Research Scientist bei Bayer HealthCare Pharmaceuticals in kardiologischen Indikationen tätig. Er ist Miterfinder des Faktor-Xa-Inhibitors Rivaroxaban.



Susanne Roehrig studierte Chemie an der Ruhr-Universität Bochum und promovierte 1997 bei Prof. P. Welzel an der Universität Leipzig. Nach einem Postdoc-Aufenthalt am Massachusetts Institute of Technology in der Gruppe von Prof. P. H. Seeberger wechselte sie an das Institut für Medizinische Chemie der Bayer HealthCare Pharmaceuticals und arbeitet dort seitdem im Bereich kardiologischer Indikationen. Sie ist Miterfinderin des Faktor-Xa-Inhibitors Rivaroxaban.

Schematische Darstellung der Schnittstellen von Prothrombin und Faktor X

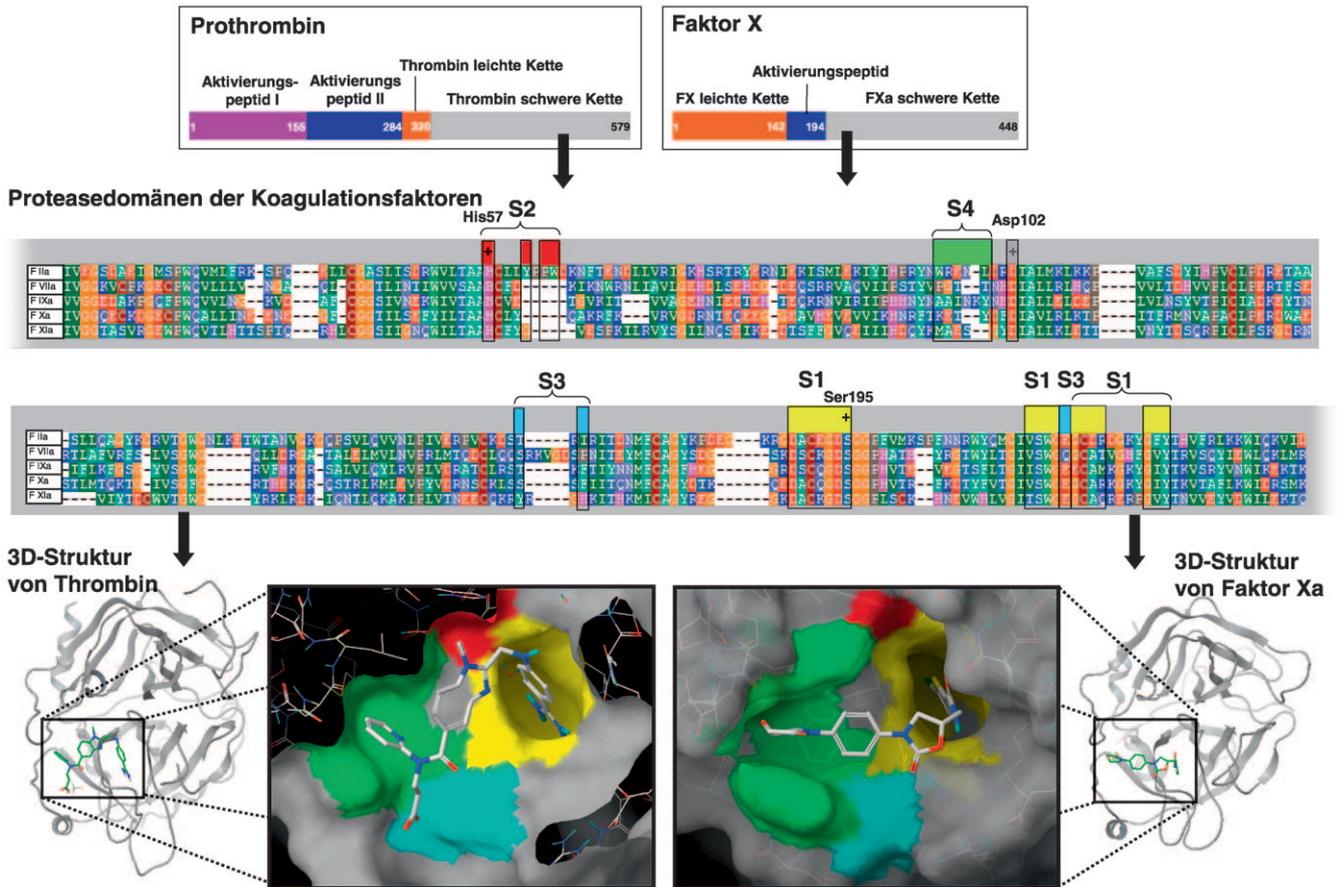


Abbildung 1. Die Gesamtsequenz von Prothrombin und FX mit ihren Schnittstellen. Die „schweren Ketten“, welche die Proteasedomänen enthalten, sind grau markiert und im Sequenz-Alignment (Mitte) von Thrombin (FIIa), FVIIa, FIXa, FXa und FXIa grau unterlegt. Die Substratbindungstaschen S1 (gelb), S2 (rot), S3 (blau) und S4 (grün) sowie die am katalytischen Mechanismus beteiligten Aminosäuren (His57, Asp102, Ser195) sind hervorgehoben. Unten: Vergleich der Substratbindungstaschen von Thrombin mit Dabigatran (links) und FXa mit Rivaroxaban (rechts). Die Einfärbung der Oberflächen der Substratbindungstaschen entspricht der beim Sequenz-Alignment gewählten Farbgebung. Farbcode der Stabmodelle der Inhibitoren: weiß/grün C, cyan H, blau N, rot O, gelb S.

kungen (Blutungen) und die notwendige engmaschige Kontrolle der Blutgerinnungsparameter in der Klinik an.

Nach wie vor gehören thromboembolische Krankheiten wie Herzinfarkt, Schlaganfall, Lungenembolie, tiefe Beinvenenthrombose und periphere arterielle Verschlusskrankheit zu den häufigsten Todesursachen. Daher besteht ein enormer

Bedarf an direkt wirkenden, oralen Antikoagulantien mit einer größeren therapeutischen Breite und zuverlässiger Wirkung.

2. Strukturvergleich und Substrateigenschaften von Thrombin und Faktor Xa

FXa besteht aus der 254 Aminosäuren langen Trypsin-artigen Serinprotease und der 142 Aminosäuren langen leichten Kette, die aus einer Glutamat-reichen „Gla“- und zwei Epidermal- Wachstumsfaktor (EGF)-artigen Domänen aufgebaut ist. FXa entsteht aus dem Vorläuferprotein FX, von dem entweder durch FIXa oder durch FVIIa ein 52 Aminosäuren langes Aktivierungspeptid abgespalten wird.

α -Thrombin ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 36 kDa und besteht aus der 36 Aminosäuren langen leichten Kette und der Trypsin-ähnlichen Peptidasedomäne (259 Aminosäuren), auch schwere Kette genannt. Das Enzym FXa spaltet aus dem 579 Aminosäuren langen Prothrombin die aus 155 und 129 Aminosäuren bestehenden Aktivie-

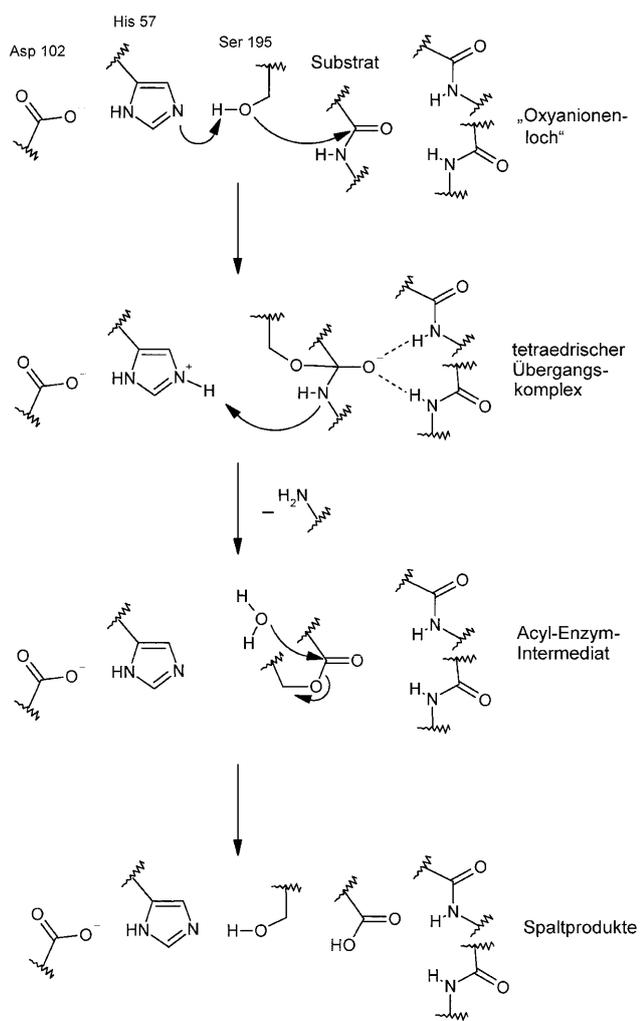


Alexander Hillisch, geboren 1971, studierte Pharmazie an der Universität Wien und wechselte für die Promotion ans Institut für Molekulare Biotechnologie in Jena. 1998 promovierte er in Biochemie bei Prof. P. Schuster und trat in die EnTec GmbH Hamburg/Jena ein. Dort baute er die Abteilung Strukturelle Bioinformatik und Wirkstoffdesign auf und leitete verschiedene Wirkstofffindungsprojekte. 2003 wechselte er als Abteilungsleiter für Computational Chemistry in die Medizinische Chemie zu Bayer HealthCare Pharmaceuticals nach Wuppertal. Die Universität Köln ernannte ihn 2010 zum Honorarprofessor.

rungspeptide 1 und 2 ab. Danach erfolgt die Trennung der leichten von der schweren Kette des Thrombins, wobei beide Stränge über eine Disulfidbrücke kovalent verbunden bleiben.

Die beiden Serinproteasedomänen von Thrombin und FXa weisen eine Sequenzidentität von 37% auf (Abbildung 1). Bei beiden Enzymen wird das katalytische Zentrum von der Triade His57, Asp102 und Ser195 gebildet (die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf das historisch früher charakterisierte Rinder-Chymotrypsinogen). Der während der Amidspaltung durch kovalente Bindung zum Serin entstehende, negativ geladene tetraedrische Übergangszustand an der Carbonylgruppe des Substrats wird durch das so genannte „Oxyanionenloch“ durch Wasserstoffbrücken mit Aminosäuren des Enzyms stabilisiert (Schema 2). Nach der Nomenklatur von Schechter und Berger werden die Aminosäuren des Substrates vom N-Terminus bis zur Schnittstelle mit P4-P3-P2-P1 bezeichnet und die entsprechenden aufnehmenden Taschen des Enzyms mit S4-S3-S2-S1.

An der tiefsten Stelle der Spezifitäts- bzw. S1-Tasche befindet sich bei beiden Enzymen die Aminosäure Asp189, die



Schema 2. Katalysemechanismus von Serinproteasen.

mit dem positiv geladenen P1-Arginin des Substrates in ionische Wechselwirkung treten und Wasserstoffbrücken bilden kann (Abbildung 2). Thrombin und FXa weisen im Sequenzvergleich im Bereich der S1-Taschen dieselben Aminosäuren auf (Abbildung 1) und sind einander dort auch in ihrer dreidimensionalen Struktur äußerst ähnlich.

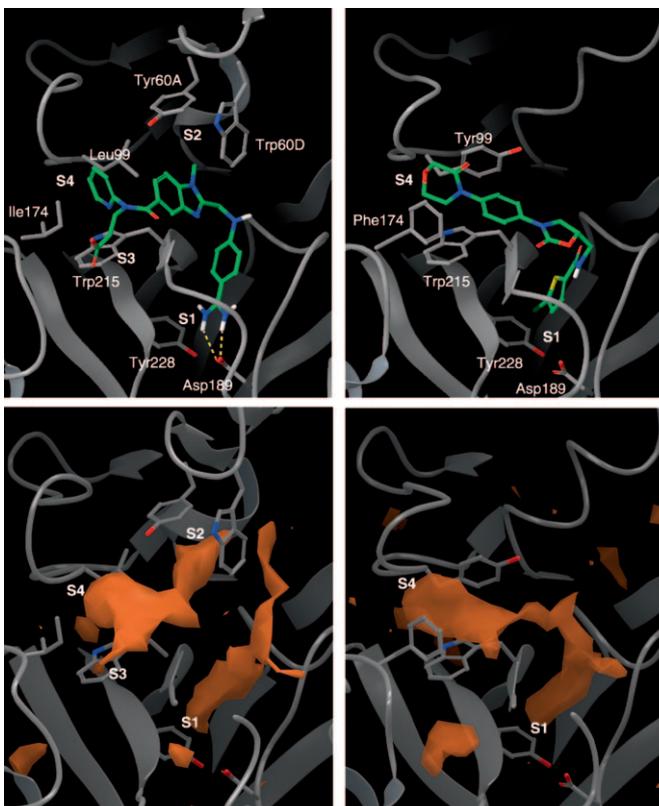


Abbildung 2. Vergleich des aktiven Zentrums in den Kristallstrukturen von Thrombin und Faktor Xa. Oben links: Thrombin mit Dabigatran (9; modelliert auf Basis der Struktur mit dem PDB-Code 1KTS); oben rechts: Faktor Xa mit Rivaroxaban (34; Kristallstruktur: PDB-Code 2W26). Unten: lipophiler Abdruck der Bindungstasche (orange Volumina), erstellt durch Abtasten der Bindungstasche mit lipophilen Probatomen; unten links: Thrombin; unten rechts: FXa.

Die Unterschiede in der Größe der S2-Tasche von Thrombin und FXa hingegen führen zur Begünstigung unterschiedlicher Substrate: FXa hat wegen der großen Seitenkette Tyr99 eine sehr kleine S2-Tasche und kann somit bevorzugt kleine Aminosäuren (z.B. Glycin) aufnehmen. Zwei exemplarische Schnittstellen (---) sind die Sequenzen Phe281-Asn282-Pro283-Arg284---Thr285-Phe286 und Tyr317-Asp318-Gly319-Arg320---Ile321-Val322 aus humanem Prothrombin. FXa schneidet zwischen Arg284 und Thr285 oder Arg320 und Ile321 (P1/P1'), was zur Abspaltung des Aktivierungspeptides 2 und der Trennung der leichten und schweren Kette und damit zur Aktivierung von Thrombin führt. Thrombin enthält eine zusätzliche, aus neun Aminosäuren bestehende „60-Insertionsschleife“ (benannt nach Trp60D), die eine relativ große lipophile S2-Tasche umgrenzt. Dieses Enzym bevorzugt in der P2-Position folglich größere Aminosäuren (z.B. Val, Pro). Zwei exemplarische Schnitt-

stellen (–/–) für Thrombin sind die Sequenzen Gly13-Gly14-Val15-Arg16–/–Gly17-Pro18 und Phe11-Ser12-Ala13-Arg14–/–Gly15-His16 aus den Fibrinogen- α - und Fibrinogen- β -Ketten. Thrombin schneidet zwischen Arg16 und Gly17 bzw. Arg14 und Gly15 (P1/P1'), was zur Freisetzung der 16 bzw. 14 Aminosäuren langen Fibrinopeptide A und B sowie zum Beginn der Polymerisierung des entstehenden Fibrins führt.

Bei beiden Enzymen sind die S3-Taschen relativ flach. Der Begriff „Tasche“ ist an dieser Stelle etwas irreführend, da die Proteinoberfläche keine nennenswerte Vertiefung in diesem Bereich bildet. Ein mit lipophilen Probeatomen theoretisch berechneter „Abdruck“ der Ligandenbindungstaschen zeigt die insgesamt signifikant größeren potenziellen lipophilen Kontakte in der Thrombintasche als in der FXa-Tasche (siehe orange Volumina in Abbildung 2).

Größere Unterschiede gibt es in der S4-Tasche. Bei Thrombin wird diese Tasche durch zwei aliphatische lipophile Aminosäuren gebildet (Leu99 und Ile174) und am Boden durch Trp215 begrenzt. Bei FXa ist sie durch die seitliche Begrenzung von aromatischen Aminosäuren (Tyr99, Phe174) recht tief und hydrophob. Auch befindet sich bei diesem Enzym im Bereich der S4-Tasche ein Ensemble mehrerer Carbonylgruppen des Proteinrückgrates, das so genannte „Kationenloch“. Somit sind hier sowohl hydrophobe wie auch elektrostatische Wechselwirkungen mit positiv geladenen Inhibitoren möglich.

3. Thrombin-Inhibitoren

Der am besten charakterisierte, natürlich vorkommende Thrombin-Inhibitor ist das Polypeptid Hirudin (65 Aminosäuren)^[5] aus dem medizinischen Blutegel (*Hirudo medicinalis*), das 1955 erstmals vom Pharmakologen Fritz Markwardt^[6] durch Extraktion aus Blutegelköpfen isoliert wurde. Hirudin ist ein bivalenter, hochselektiver und praktisch irreversibler Inhibitor ($K_i = 22$ fM), der gleichzeitig an der Fibrinogenbindungsstelle von Thrombin bindet und über einen Ausläufer das aktive Zentrum des Thrombins hemmt. Hirudin wird heutzutage gentechnisch rekombinant hergestellt.

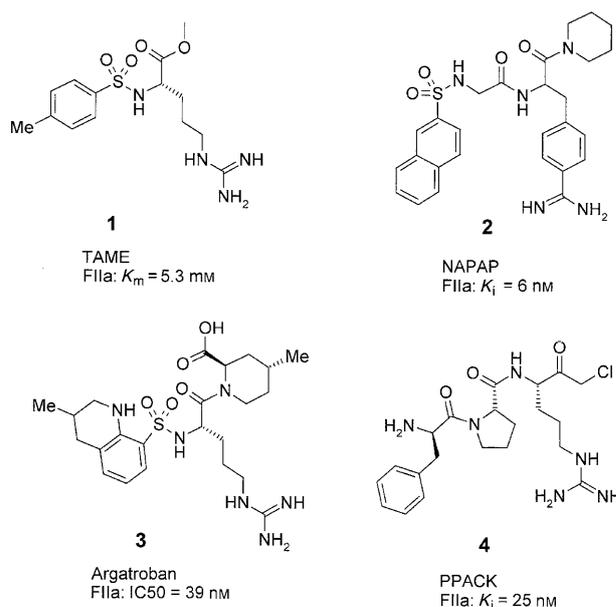
Erste In-vivo-Untersuchungen^[7] mit Hirudin Anfang der 1980er Jahre zeigten, dass spezifische Thrombin-Inhibitoren ein großes Potenzial für die Entwicklung neuartiger Antikoagulantien haben. Daraufhin haben zahlreiche Arbeitsgruppen Programme zur Entwicklung synthetischer Inhibitoren gestartet, wobei mehrere Konzepte verfolgt wurden. Zum einen wurden in Analogie zum Hirudin bivalente Inhibitoren entwickelt:

Hirulog,^[8] ein synthetisches Analogon des Hirudins mit 20 Aminosäuren, ist als direkter, bivalenter reversibler Thrombin-Inhibitor mit einer kurzen Eliminationshalbwertszeit von ca. 25 Minuten unter dem Namen Bivalirudin (bivalent hirudin, Angiox) auf dem Markt. Bivalirudin hemmt Thrombin durch Bindung an das aktive Zentrum und an die Fibrinogenbindungsstelle. Diese Hemmung ist reversibel, da Thrombin das Bivalirudin spaltet und beide Fragmente nur noch eine geringe Affinität zu Thrombin haben. Beim Patienten lässt die Wirkung deshalb rasch nach. Durch die Pro-

teolyse gehen 80% des Bivalirudins verloren, während 20% intakt über die Nieren ausgeschieden werden.

Der Großteil der Forschungsprogramme zielt aber auf monovalente Inhibitoren ab, die nur das aktive Zentrum des Thrombins blockieren.

Die primäre Spaltungsstelle im Substrat Fibrinogen liegt für Thrombin zwischen den Aminosäuren Gly und Arg, weshalb die ersten potenten direkten Thrombin-Inhibitoren (DTI) auch basische Argininderivate waren (Schema 3). Die ersten Prototypen dieser Subklasse, NAPAP (**2**)^[9] von der Gruppe um Stürzebecher und Argatroban (**3**)^[10] von der Gruppe um Mitsubishi, leiten sich beide vom Argininderivat TAME (**1**)^[11] ab, das selbst aber nur schwach wirksam ist.



Schema 3. Basische Thrombin-Inhibitoren.

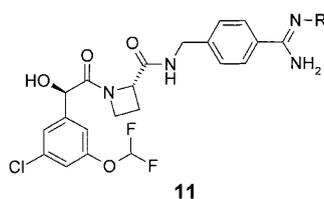
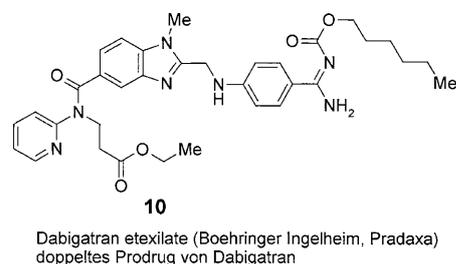
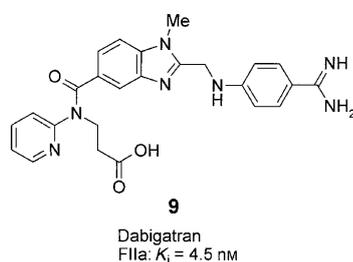
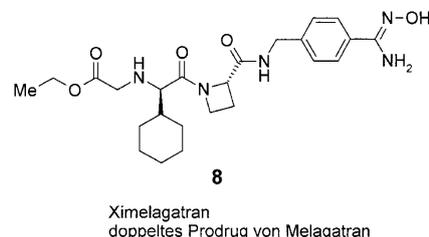
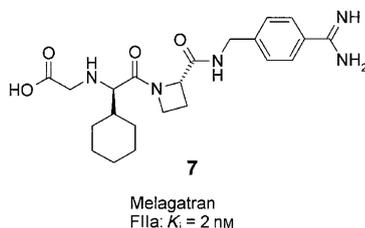
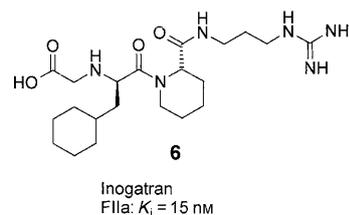
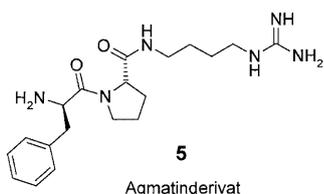
Ihren Molekülstrukturen im Kristall zufolge^[12] sind beide Verbindungen monovalente, direkte Thrombin-Inhibitoren, die selektiv an die aktive katalytische Bindungsstelle des Thrombins binden. Die jeweilige Arylsulfonyleinheit füllt die hydrophobe S4-Tasche aus, und die basische Amidinyl- oder Guanidinyleinheit geht eine direkte elektrostatische Wechselwirkung mit der Aminosäure Asp189 am Boden der S1-Tasche ein.^[13] Wegen dieser stark basischen P1-Reste sind beide Wirkstoffe allerdings nicht oral bioverfügbar. Argatroban (**3**) ist der einzige Vertreter dieser ersten Generation, der die klinische Entwicklung durchlaufen hat und erstmals 1990 in Japan zur parenteralen antithrombotischen Therapie zugelassen wurde (Argatra).

Eine andere Klasse von Thrombin-Inhibitoren enthält das Tripeptidmotiv D-Phe-Pro-Arg. Dieses Motiv ist abgeleitet von den Aminosäuren, die am Bindungsmodus von Fibrinopeptid A beteiligt sind, einem inhibitorisch wirkenden Produkt der Thrombin-katalysierten Spaltung des Fibrinogens. Das Peptid D-Phenylalanyl-L-Prolyl-L-Arginin-Chlormethylketon **4** (PPACK) hemmt als irreversibler Inhibitor sehr potent Thrombin.^[14] 1989 wurde von Bode und Mitarbeitern die Struktur des Komplexes von humanem Thrombin mit

PPACK (**4**) im Kristall veröffentlicht.^[15] Auch hier geht die basische Seitenkette des P1-Arginylrestes eine elektrostatische Wechselwirkung mit der freien Carboxygruppe von Asp189 der S1-Tasche ein. Der Pyrrolidinring des Prolins und der Phenylrest des D-Phenylalanins sind in den beiden hydrophoben Bindungstaschen S2 und S4 des Thrombins lokalisiert. Die Chlormethylketonfunktion des Arginylrestes bindet kovalent an die Hydroxygruppe von Ser195 in Form eines Halbketals und alkyliert das Imidazolstickstoffatom von His57 im aktiven Zentrum. Eine Modifizierung dieser Aminosäurereste führt zum vollständigen Verlust der katalytischen Aktivität.

Polypeptidstrukturen ermöglichen zwar viele Interaktionen mit Thrombin und ergeben so potente Inhibitoren; da aber nur Inhibitoren mit kleinen Molekülmassen ($< 500 \text{ g mol}^{-1}$) die Chance haben, das gastrointestinale Epithel zu passieren und in die Blutbahn zu gelangen, wurden die 1982 von Bajusz et al. offengelegten Dipeptidstrukturen wie D-Phe-Pro-Agmatin (**5**),^[16] obwohl nur schwach wirksam, zum wichtigen Startpunkt weiterer Forschungsarbeiten (Schema 4). AstraZeneca verfolgte als erste erfolgreich diesen Dipeptidansatz und entwickelte ausgehend von **5** den klinischen Kandidaten Inogatran (**6**) mit über 100-mal höherer In-vitro-Potenz, der allerdings eine nur unzureichende Bioverfügbarkeit aufweist und relativ schnell ausgeschieden wird.

Nach der Aufklärung der Molekülstruktur^[15] des Komplexes von humanem Thrombin mit dem irreversibel gebundenen Inhibitor PPACK (**4**) im Kristall Ende der 1980er Jahre profilierten Forscher bei AstraZeneca mehr als 100 potenzielle Inhibitoren in ihrem Computermodell und kamen so zu dem gegenüber Inogatran (**6**) 8-fach potenteren klinischen Kandidaten Melagatran (**7**). Die ersten klinischen Studien ergaben, dass **7** mit einer oralen Bioverfügbarkeit von nur 3–7% für eine orale Therapie nicht geeignet ist, zumal unvorhersagbare, variable Plasmakonzentrationen und ein ausgeprägter Nahrungsmittelleffekt beobachtet wurden.^[17,18] Mit zwei basischen Gruppen (Benzamidinyl- und sekundäre Aminogruppe) und einer sauren Carbonsäuregruppe ist **7** eine netto immer noch positiv geladene Verbindung, die bei intestinalem pH-Wert protoniert vorliegt und dadurch nur



R=OMe: Atecegatran fexenetil (AZD-0837, AstraZeneca)
R=H: Atecegatran (AR-H067637)
FIIa: $K_i = 2\text{--}4 \text{ nM}$

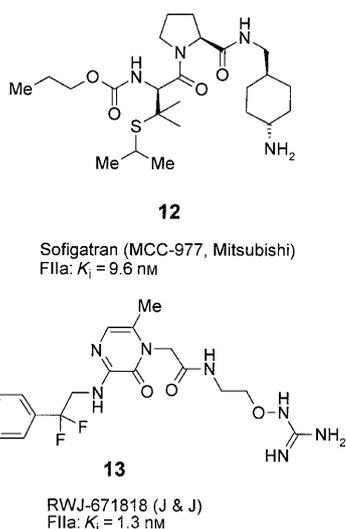
Schema 4. Entstehungsgeschichte von Thrombin-Inhibitoren und ihre Prodrugs.

schlecht durch das lipophile Gastrointestinalepithel dringen kann. Es gelang jedoch, Melagatran in ein lipophileres Doppelprodrug (**8**, Ximelagatran, Exanta) umzuwandeln, das nach erfolgreicher Absorption schnell wieder zum aktiven Wirkstoff Melagatran metabolisiert wird. **8** wurde der erste orale Thrombin-Inhibitor, der den Weg in die Klinik schaffte. Es ist 170-fach lipophiler als Melagatran (**7**) und liegt bei physiologischen pH-Wert praktisch ungeladen vor, was in einer 80-fach besseren Absorption und somit in einer 4-fach besseren oralen Bioverfügbarkeit von 18–24% resultiert. Gründe sind die geringere Basizität des Hydroxyamidins gegenüber jener des Amidins sowie der stark herabgesetzte pK_a -Wert des N-terminalen sekundären Amins wegen der Ethylestergruppierung. 2004 wurde der Wirkstoff zwar in Europa zugelassen, Anfang 2006 dann aber nach Ablehnung der Zulassung durch die FDA wegen Problemen mit Lebertoxizität wieder vom Markt genommen.

Die Entwicklung anderer DTIs wurde aber weiter vorangetrieben, und so konnte Boehringer Ingelheim mit Dabigatran etexilate^[19] (**10**, Pradaxa) 2008 den ersten DTI auf den Markt bringen. Dieser Wirkstoff wurde ebenfalls aufbauend auf einem strukturgetriebenen Ansatz entwickelt, auf der Grundlage einer peptidischen DTI-Struktur in Komplex mit Rinderthrombin.^[20] Dabigatran etexilate (**10**) ist ein doppeltes Prodrug, und die pharmakologisch aktive Komponente, Dabigatran (**9**), wird hieraus nach oraler Gabe im Menschen durch Esterase-vermittelte Hydrolyse sehr schnell, mit einer absoluten Bioverfügbarkeit von 6–7%, freigesetzt.^[21]

Ein weiterer peptidischer Thrombin-Inhibitor von AstraZeneca, das Prodrug AZD-0837^[22] (**11**, Atecegatran fexenetil) mit einer oralen Bioverfügbarkeit von 22–52%,^[23] war 2008 für die Phase III der klinische Entwicklung vorgesehen. Wegen mangelnder Stabilität der Tablettenformulierung wurde diese Studie auf 2009 verschoben, und seitdem ist kein Start einer weiteren Studie bekannt gegeben worden.

Auch andere basische, aber nichtamidinische Inhibitoren wurden in der Klinik untersucht: MCC-977 (**12**, Sofigatran; Schema 5)^[24] von Mitsubishi Tanabe Pharma, mit einem

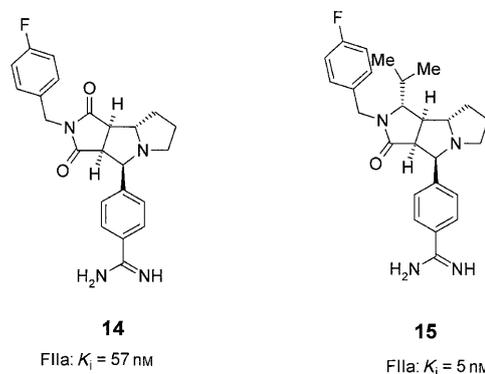


Schema 5. Thrombin-Inhibitoren.

Aminocyclohexylrest als S1-Binder, gelangte 2003 bis in die Phase II, die Entwicklung wurde aber im November 2007 abgebrochen. Wissenschaftler von Johnson & Johnson berichteten unlängst von Inhibitoren mit einem Oxyguanidiny-P1-Rest, die einen deutlich reduzierten pK_a -Wert von 7–7.5 gegenüber jenem von Guanidin (pK_a 13–14) aufweisen.^[25] So zeigt RWJ-671818 (**13**) nicht nur eine hohe Wirksamkeit in verschiedenen In-vivo-Thrombosemodellen, sondern nach oraler Gabe in Hunden auch eine hohe Bioverfügbarkeit. Wegen des vorteilhaften präklinischen Profils wurde RWJ-671818 in gesunden Probanden im Rahmen von Phase-I-Studien untersucht, die erfolgreich abgeschlossen werden konnten.

Banner et al. konnten zeigen, dass sich Fluorwechselwirkungen gut zur Erhöhung der Affinität und Selektivität für

die Substratbindungstasche von Thrombin eignen: Die 4-Fluorsubstitution am benzylichen P4-Rest in einer Serie von tricyclischen Thrombin-Inhibitoren wie **14** (Schema 6) bewirkt eine 5–10-fache Erhöhung der Affinität gegenüber der entsprechenden Liganden mit anderem Fluorierungsmuster.



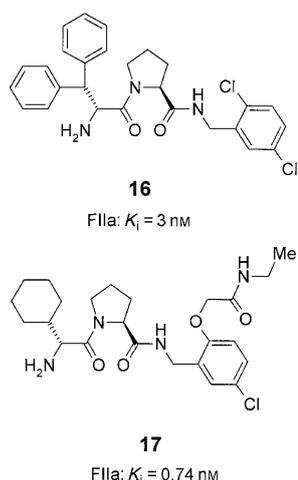
Schema 6. Thrombin-Inhibitoren mit 4-Fluorsubstitution in der P4-Seite.

Die Röntgenstrukturanalyse des Thrombin-Liganden-Komplexes zeigt eine günstige C-F...H-C $_{\alpha}$ -C=O- und C-F...C=O-Wechselwirkung des 4-Fluorsubstituenten am Liganden mit der H-C $_{\alpha}$ -C=O-Einheit des Asn98. Zusätzlich resultierte die Einführung einer Isopropylgruppe am tricyclischen Grundgerüst des Liganden **15** in einer besseren Ausfüllung der S2-Tasche und somit in einer zusätzlichen Erhöhung der Affinität um einen Faktor 11.^[26]

Um die Notwendigkeit einer Prodrugbildung zum Erreichen oraler Bioverfügbarkeit für basische Inhibitoren zu umgehen, wurde seit Anfang der 1990er Jahre auch intensiv nach nichtbasischen P1-Resten gesucht. 1993 publizierte Sandoz Pharma in Kooperation mit dem Londoner Thrombosis Research Institute und der Universität Cambridge das erste Beispiel für einen direkten Thrombin-Inhibitor mit neutralem P1-Rest, ein peptidisches Boronsäureesterderivat mit einer Methoxypropyl-P1-Seitenkette, das kovalent bindet. Die Boronsäureestergruppe wird unter physiologischen Bedingungen schnell zur Boronsäure hydrolysiert, die wiederum in Thrombin ein Addukt mit Ser195 bildet.^[27]

Merck (USA) berichtete 1998 von nichtkovalent bindenden Inhibitoren mit neutralen P1-Resten,^[28] bei denen ein Chlorsubstituent die Wechselwirkung in der S1-Tasche mit der Aminosäure Tyr228 übernimmt. Dieser neue, von Merck (USA) zuerst publizierte Bindungsmodus, der an die Stelle einer direkten elektrostatischen Wechselwirkung eines basischen P1-Restes mit der Aminosäure Asp189 tritt, wird auch bei vielen nichtbasischen Faktor-Xa-Inhibitoren genutzt. In jüngster Zeit wurde spekuliert, dass zusätzliche Halogenbindungswechselwirkungen mit Carbonylgruppen des Peptidrückgrats eine wichtige Rolle spielen.^[42]

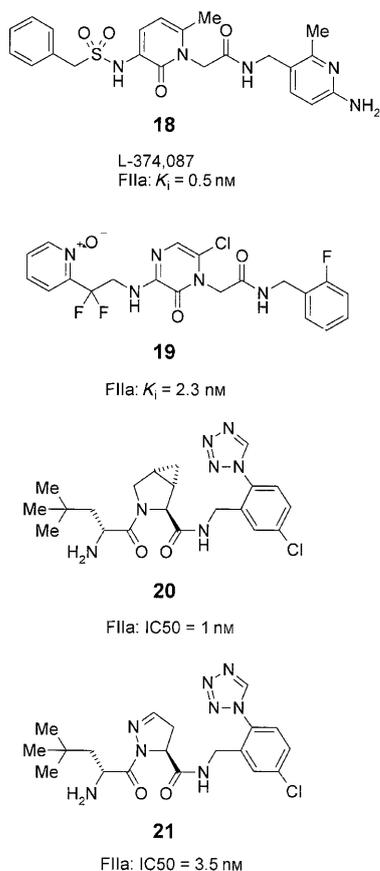
Verbindung **16** (Schema 7) mit einem Dichlorbenzyl-S1-Rest ist zwar oral bioverfügbar, aber sehr lipophil, was mit einer hohen Plasmaproteinbindung und einer unzureichenden Wirkung in den In-vivo-Thrombosemodellen einhergeht.



Schema 7. Thrombin-Inhibitoren mit nichtbasischen P1-Gruppen.

Versuche, diese Substrukturklasse ohne Verlust an Potenz und Bioverfügbarkeit deutlich polarer zu machen, ergaben z. B. **17**. Die Herausforderung bei dieser Klasse blieb aber, die Halbwertszeit zu verlängern, ohne das bisherige, vorteilhafte Profil hinsichtlich Potenz, Selektivität, In-vivo-Wirksamkeit und oraler Bioverfügbarkeit zu verlieren.

Parallel dazu wurden peptidmimetische Grundstrukturen mit einem zentralen Pyridinonbaustein untersucht: Das Pyridinonderivat L-374,087 (**18**; Schema 8) mit ungenügender



Schema 8. Thrombin-Inhibitoren mit nichtbasischen P1-Gruppen.

oralen Bioverfügbarkeit und metabolischer Stabilität wurde über mehrere Lernzyklen zum Pyrazinonderivat **19**^[29] mit ausreichender Bioverfügbarkeit, besserer metabolischer Stabilität und Löslichkeit optimiert. Untersuchungen zum Bindungsmodus ergaben,^[29] dass der Fluor-substituierte Benzylaminrest in der S1- und der Chlorpyridazinyl-Rest in der S2-Tasche lokalisiert sind. Die *N*-Oxidgruppe, die nicht nur signifikant zur besseren Löslichkeit beiträgt, sondern auch die Potenz verdoppelt, zeigt ins Lösungsmittel und scheint keine spezifische Wechselwirkung mit dem Thrombingrundgerüst einzugehen. Vielmehr scheint das π -defiziente P3-Pyridyl-*N*-oxid die Kante-zu-Fläche-Wechselwirkung mit der π -reichen Aminosäure Trp215 in der S4-Tasche zu verstärken.

Neuere Patentanmeldungen von AstraZeneca beanspruchen potente Azabicyclohexane wie **20**^[30] und Dihydro-1*H*-pyrazole wie **21**^[31] mit Chlortetrazolylbenzylresten, wobei der Chlorsubstituent in der S1-Tasche mit der Aminosäure Tyr228 wechselwirkt und der anellierte Cyclopropylring in der S2- und die *tert*-Butylgruppe in der S4-Tasche lokalisiert sind.

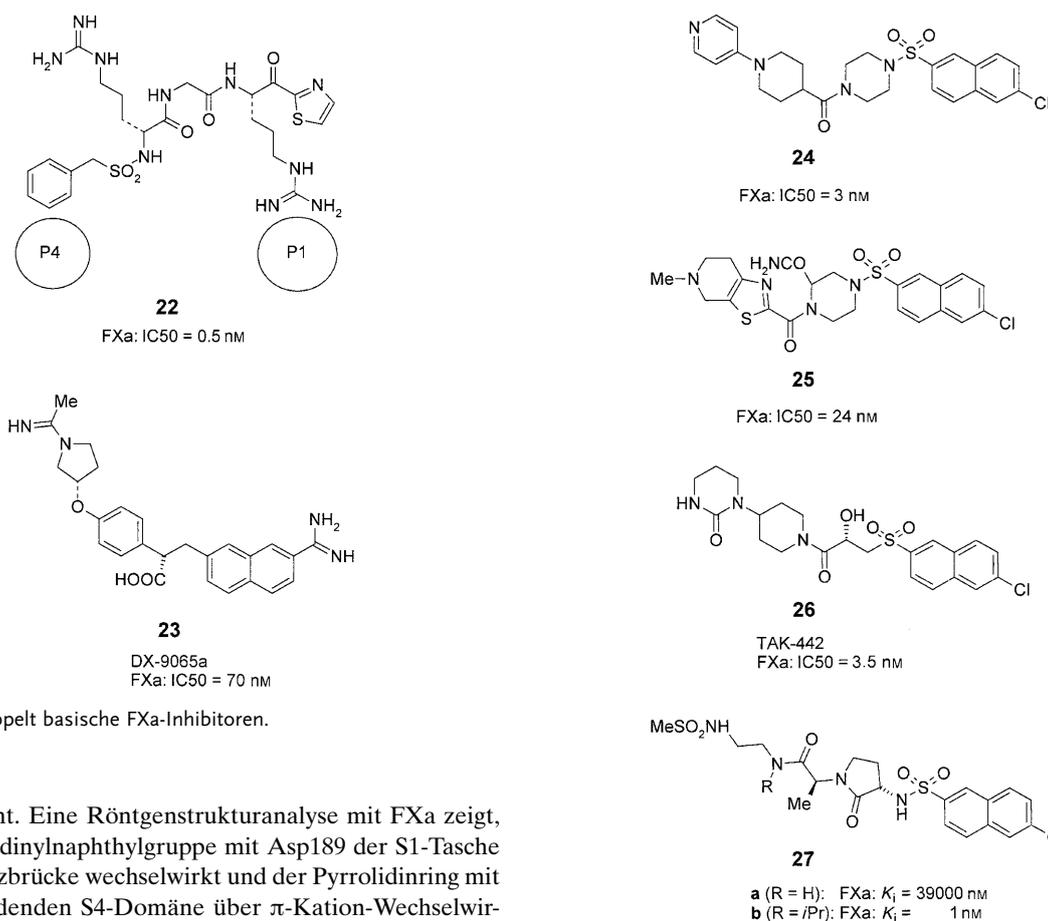
Man kann festhalten, dass in den letzten 30 Jahren trotz vieler, auch strukturell sehr unterschiedlicher Ansätze zur Auffindung von direkten Thrombin-Inhibitoren bisher nur ein Wirkstoff auf den Markt gebracht werden konnte: das doppelte Prodrug Dabigatran etexilate (**10**) von Boehringer Ingelheim.

4. Faktor-Xa-Inhibitoren

Die bekanntesten natürlichen, direkten FXa-Inhibitoren sind das Antistasin (119 Aminosäuren) vom Blutegel *Hementeria officinalis* und das tick anticoagulant peptide (TAP, 60 Aminosäuren) von der Zecke *Ornithodoros moubata*; sie sind jedoch nicht oral bioverfügbar.^[32] Dies war Anlass für eine intensive Suche nach kleinen, oral bioverfügbaren Inhibitormolekülen.^[33]

Anfangs konzentrierte sich das Inhibitor-design auf dibasische Peptidanaloga, die eine reversible kovalente Bindung mit dem katalytischen Serin eingehen und den Übergangszustand des Enzym-Substrat-Komplexes simulieren (Schema 9).^[34] In Verbindung **22** von COR Therapeutics wird diese Bindung durch die Ketongruppierung bewirkt, während der Thiazolylrest mit dem Histidin der katalytischen Triade eine H-Brücke bildet. Der Arginin-artige Rest wechselwirkt mit der Carbonsäure von Asp189 der S1-Tasche. Am P4-Ende des Moleküls kommt der Benzylsulfonylrest in der hydrophoben Tasche zu liegen, während die zweite Argininseitenkette mit dem Kationenloch H-Brücken bildet. Diese Verbindung hat allerdings drei Nachteile: Ihre Peptidnatur ergibt nachteilige pharmakokinetische Eigenschaften und kurze Halbwertszeiten. Die Basizität führt zu einer schlechten oralen Bioverfügbarkeit, da große, unter physiologischen Bedingungen positiv geladene Moleküle schlecht im Magen-Darm-Trakt resorbiert werden. Ihr auf kovalenten Wechselwirkungen beruhender Wirkmechanismus birgt außerdem ein erhöhtes Potenzial für toxische Nebenwirkungen.

1993 stellte Daiichi den ersten nichtkovalenten, nicht-peptidischen FXa-Inhibitor vor: DX-9065a (**23**).^[35] Auch diese Verbindung ist dibasisch; ihre orale Bioverfügbarkeit ist



Schema 9. Doppelt basische FXa-Inhibitoren.

daher schlecht. Eine Röntgenstrukturanalyse mit FXa zeigt, dass die Amidinyl-naphthylgruppe mit Asp189 der S1-Tasche über eine Salzbrücke wechselwirkt und der Pyrrolidinring mit der Aryl-bindenden S4-Domäne über π -Kation-Wechselwirkungen bindet. Zusätzlich befindet sich die Acetimidoylgruppe im Kationenloch, wobei die positive Ladung mit Glu97 und Lys96 wechselwirkt.

Es gab intensive Forschungsarbeiten, um mit weniger basischen Argininmimetika einen Kompromiss aus Affinität zum Enzym und oraler Bioverfügbarkeit zu erzielen.^[36] 1996 veröffentlichte Zeneca FXa-Inhibitoren wie **24** (Schema 10) mit einer nur noch schwach basischen Gruppe.^[37] Lange Zeit wurde hier irrtümlicherweise die Pyridylpiperidinylgruppe für die basische P1-Gruppe gehalten.^[36] Aus einer Röntgenstrukturanalyse mit Trypsin wurde jedoch ersichtlich, dass sich die Chlornaphthylgruppe in der S1-Tasche befindet. Es lag nahe, dass eine vergleichbare Orientierung auch für FXa zutrifft.^[38] Für eine Weiterentwicklung von Daiichi, die Verbindung **25**, konnte dieser Bindungsmodus mit Chlornaphthalin in der S1-Seite explizit gezeigt werden.^[39]

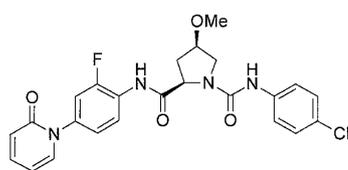
Eine weitere Chlornaphthylverbindung, TAK-442 (**26**), befindet sich in Phase II der klinischen Entwicklung für die Behandlung von Lungenembolien, Schlaganfall und akutem Koronarsyndrom.^[40] Auch hier bestätigt die kristallographisch bestimmte Struktur im Komplex mit humanem FXa, dass die 6-Chlornaphthylgruppe die S1-Substratbindungstasche besetzt, wobei das Chloratom eine hydrophobe Wechselwirkung mit dem *Aren* von Tyr228 eingeht. Das Sulfonylsauerstoffatom ist an einer H-Brücke mit Gln192 beteiligt. Ferner ist eine H-Brücke zwischen dem Sauerstoffatom der Amidcarbonylgruppe bzw. der Hydroxygruppe und der Rückgrat-NH-Einheit von Gly219 bzw. Gly216 zu beobachten. Die cyclische Harnstoffgruppierung wechselwirkt mit

Schema 10. FXa-Inhibitoren mit Chlornaphthylresten als P1-Gruppe.

den aromatischen Aminosäuren der S4-Tasche, wobei die Carbonylgruppe einen Wasser-vermittelten Kontakt mit dem Amidsauerstoffatom von Lys96 bildet. Die Hydroxygruppe bewirkt bei TAK-442 (**26**) nicht nur eine stärkere Affinität zu FXa, sondern führt auch zu einer Stabilisierung des Moleküls gegen eine hydrolytische Spaltung des benachbarten Amids durch sterische Abschirmung. Auf die Hydroxyderivate stieß man ursprünglich, als man den Metabolismus der nichthydroxylierten Verbindungen untersuchte.

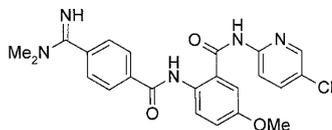
Bei einem Inhibitor von Glaxo, **27a** (R = H), konnte durch die Einführung einer Isopropylgruppe in der P4-Region (**27b**; R = *i*Pr) eine beeindruckende, 40000-fache Wirksteigerung erreicht werden.^[41] Grund hierfür ist die erhöhte lipophile Wechselwirkung der Isopropylgruppe mit der aromatischen S4-Tasche. Hinzu kommt die Verdrängung von Solvatwasser aus der lipophilen Tasche, ein Effekt, den die verwandte, wirksschwache NH-Verbindung nicht leisten kann.^[42]

Anstelle eines Chlornaphthylrestes hat Eribaxaban (**28**),^[43] ein ehemaliger Entwicklungskandidat von Pfizer, eine Chloranilinogruppe als P1-Rest (Schema 11). Wegen der kanzerogenen Eigenschaften von Chloranilin wurde sie durch Chlorpyridin ersetzt. Diese Gruppe ist Bestandteil von Betrixaban (**29**),^[62] einem Entwicklungskandidaten von Portola/Merck (US). An analogen Derivaten wurde gezeigt, dass die Chlorpyridyleinheit nicht nur die Cl- π -Wechselwirkung mit



28

Eribaxaban
FXa: IC50 = 0.32 nM



29

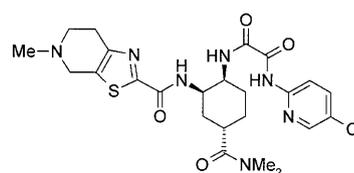
Betrixaban
(PRT-54021, PRT-021)
FXa: IC50 = 1.5 nM

Schema 11. FXa-Inhibitoren mit Chloranilino- und Chlorpyridylresten als P1-Gruppe.

Tyr228 in der S1-Tasche, sondern auch über die Amid-NH-Gruppe eine H-Brücke zum Gly218 bildet.^[61] Obwohl Betrixaban (**29**) eine unter physiologischen Bedingungen protonierte Amidinylgruppe trägt, welche die π -Kation-Wechselwirkungen in der lipophilen S4-Tasche eingeht, zeigt es eine überraschend gute orale Bioverfügbarkeit am Affen von knapp 60%. Da ein entsprechendes Derivat mit einer cyclischen Guanidinylgruppierung an dieser Position bei einem pK_a -Wert von 14 nur eine sehr geringe orale Bioverfügbarkeit (< 1% an Ratten) aufweist, liegt der Grund offensichtlich in den geringeren pK_a -Wert von 10 des Benzamidins. Günstig wirkt sich in diesem Zusammenhang auch die *N,N*-Dimethylsubstitution aus, die zwar nicht in der S1-Tasche, wohl aber in der S4-Tasche sterisch toleriert wird.^[44]

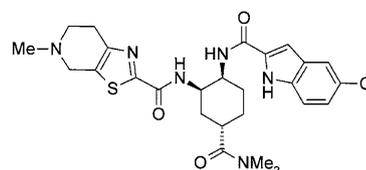
Ein wichtiger Aspekt der Arzneimittelsicherheit betrifft die Inhibition der kardialen hERG-Kaliumkanäle, die immer wieder bei Wirkstoffen als Nebenwirkung beobachtet wird und die Gefahr kardialer Arrhythmien mit sich bringt. Von dieser Problematik sind lipophile Moleküle mit positiv geladenen Aminen und Benzamidinen wie im Betrixaban bevorzugt betroffen, da sie die positive Ladung des Kaliumkations imitieren.^[45] Die Arbeiten zu Betrixaban zeigten, dass Chloranthranilamidgruppen im Mittelteil des Inhibitormoleküls eine signifikante hERG-Inhibition verursachen. Erst der Ersatz des Chloratoms durch eine weniger lipophile Methoxygruppe ermöglichte mit einer 16-fach verringerten hERG-Inhibition die Durchführung klinischer Studien;^[62] viele andere Derivate bedurften aber einer innermolekularen Kompensation der positiven Ladung durch eine Carboxylatgruppe.^[45]

Umfangreiche Arbeiten wurden bei Daiichi durchgeführt und waren Gegenstand mehrerer zum Teil über 1000-seitiger Patentanmeldungen^[46] und Publikationen. Das Ergebnis der Arbeiten war Edoxaban (**30**; Schema 12),^[47] für das 2010 die Zulassung in Japan eingereicht wurde.^[48] Um die metabolische Stabilität des Cyclohexandiaminkerns zu verbessern, wurde hier eine Dimethylamideinheit angehängt. Als P1-Gruppe liegt ein Chlorpyridylrest vor. In einem Nachfolge-



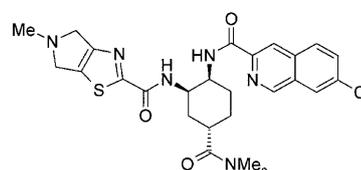
30

Edoxaban
(DU-176b)
FXa: K_i = 0.6 nM



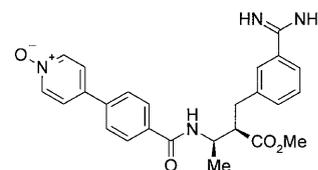
31

DT-831j
FXa: IC50 = 2.3 nM



32

FXa: IC50 = 9.5 nM



33

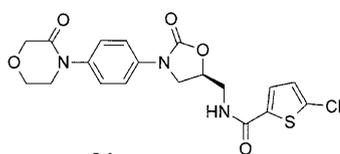
Otamixaban
FXa: K_i = 0.4 nM

Schema 12. FXa-Inhibitoren.

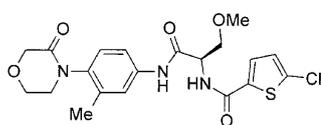
kandidaten, DT-831j (**31**), wurde hieraus ausgehend von **30** durch Einbezug einer Carbonylgruppe eine Anellierung zum bicyclischen Chlorindol durchgeführt.^[49] Daraus resultiert in der S1-Seite eine zusätzliche H-Brücke der Indol-NH-Einheit mit dem Gly218-Carbonylsauerstoffatom. Die Molekülstruktur der verwandten Verbindung **32** (mit einem Chlorisochinolinyl-P1-Rest) im Kristall zeigt eine Wasser-vermittelte H-Brücke zwischen dem Ringstickstoffatom und Ser195 sowie eine H-Brücke zwischen dem Isochinolinyl-H4-Atom und der Gly218-Carbonylamideinheit im Enzym. Als P4-Rest zeigte der Dihydropyrrolo[3,4-d]thiazolylrest gegenüber dem Sechsring-anellierten Tetrahydro-5-methylthiazolo[5,4-c]pyridin in **31** eine verringerte Lipophilie und geringere Plasmaproteinbindung, verbunden mit einer stärkeren antikoagulatorischen Aktivität im Plasma, sowie eine bessere Löslichkeit, wodurch seine orale Aktivität weniger durch die Nahrungsmittelaufnahme beeinflusst wird.^[49c] Otamixaban (**33**)^[50] von Aventis befindet sich in Phase III der klinischen

Entwicklung für den Einsatz gegen akutes Koronarsyndrom. Es enthält als P1-Gruppe einen Benzamidinylrest und ist mit einer kurzen Halbwertszeit nur für intravenöse Anwendung geeignet. Der Pyridyl-*N*-oxidrest zeigt in die S4-Tasche und bildet dort eine Wasser-vermittelte H-Brücke zum Carboxylsauerstoffatom von Ile175.

Rivaroxaban (**34**; Schema 13) von Bayer HealthCare kam 2008 als erster direkter, oral wirksamer Faktor-Xa-Inhibitor auf den Markt.^[51] Hier übernimmt eine Chlorthienyleinheit


34

Rivaroxaban (Xarelto(R))
 FXa: IC50 = 0.7 nM

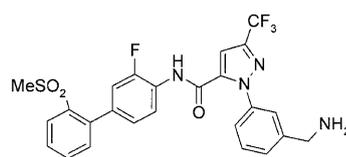

35

EMD 495235
 FXa: IC50 = 5.5 nM

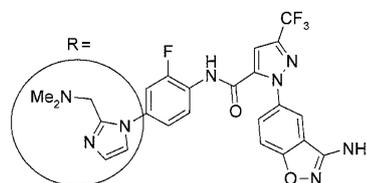
Schema 13. FXa-Inhibitoren mit Chlorthienylresten als P1- und einer Morpholinonyleinheit als P4-Gruppe.

die Funktion der P1-Gruppe, wobei das Chloratom eine hydrophobe Kante-zu-Fläche-Cl $\cdots\pi$ -Wechselwirkung mit dem Aren von Tyr228 eingeht und ein an dieser Stelle positioniertes Wassermolekül verdrängt, was einen zusätzlichen entropischen Bindungsbeitrag liefert. Die Morpholinoncarbonylgruppe des P4-Restes führt zu einer senkrechten Verdrehung des Morpholinonrings zum Aren und polarisiert die Ring-CH₂-Gruppe oberhalb von Trp215, was die CH₂ $\cdots\pi$ -Wechselwirkung verstärkt.^[42] Das bei Rivaroxaban vorliegende Kombinationsmuster aus P1- und P4-Rest erwies sich als besonders effizient und wurde auch bei anderen Grundkörpern wie **35**^[52] und **50** adaptiert.

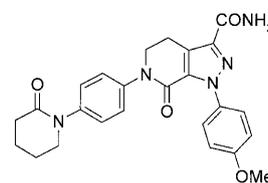
Razaxaban (**37**; Schema 14) war in Phase II der klinischen Entwicklung.^[53] Seine Molekülstruktur wurde von dem für Trypsin nicht so selektiven FXa-Inhibitor DPC423 (**36**) abgeleitet. DPC423 war mit seiner gegenüber einem Benzamidin abgeschwächt basischen Benzylamin-P1-Gruppe oral bioverfügbar. Razaxaban hat stattdessen einen nichtbasischen und größeren P1-Aminobenzisoxazolylrest, wobei die Aminogruppe für die Wechselwirkung mit Asp189 in der S1-Tasche und mit Gly218 verantwortlich ist. Da die S1-Tasche von Faktor Xa wegen des kleineren Ala190 größer ist als die von Trypsin mit Ser190 an der gleichen Stelle, konnte hierdurch die relative Affinität für FXa gegenüber der für Trypsin von 440-fach auf >25000-fach erhöht werden. Der neue Heterocyclus verschlechterte aber in Verbindung mit dem (Methylsulfonyl)phenylrest von DPC423 die Löslichkeit des Moleküls so stark, dass auf der P4-Seite ein Imidazolylrest mit (Dimethylamino)methyleinheit eingebaut werden musste.


36

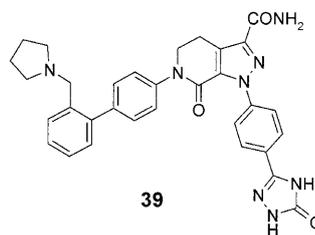
DPC423
 FXa: K_i = 0.15 nM


37

Razaxaban
 FXa: K_i = 0.19 nM
 R = 2-PhCH₂NH₂ FXa: K_i = 2.0 nM
 R = 2-PhCH₂NMe₂ FXa: K_i = 0.2 nM
 R = 2-PhCH₂NMe₃ Br FXa: K_i = 0.05 nM


38

Apixaban
 FXa: K_i = 0.08 nM


39

FXa: K_i = 0.25 nM
 PT EC2x = 4.4 μM

Schema 14. FXa-Inhibitoren vom Apixaban-Typ.

Dies führte zu einer Verbesserung von Löslichkeit und Darmwandpermeabilität sowie zu einer Verringerung der Plasmaeiweißbindung. Das N3-Stickstoffatom des Imidazolrings bildet eine H-Brücke zu Glu97 der S4-Tasche.

Zu berücksichtigen sind aber auch Metabolismus und Toxikologie eines Entwicklungskandidaten. Cytochrom-P450-Inhibition und -Induktion in der Leber führen zu unerwünschten Arzneimittelwechselwirkungen. Bei DPC423 können die im Verlauf der Metabolisierung der Benzylaminogruppe durch CYP-Enzyme entstehenden, reaktiven Intermediate toxische Effekte hervorrufen.^[54] Außerdem war bei Vertretern der Substanzklasse von DPC423 die amidische Anbindung des P4-Teils metabolisch instabil und führte zur Freisetzung von mutagenem Methylsulfonylbiphenylanilin.^[55] Um die Anbindung zu stabilisieren, wurde im Verlauf der weiteren Optimierung zum klinischen Kandidaten Apixaban

(38) die Anilineinheit durch eine zusätzliche Brücke mit dem Pyrazolkern verbunden.

Apixaban (38) ist ein weiterer nichtbasischer FXa-Inhibitor von Pfizer/BMS, dessen Zulassung beantragt wurde. Die Röntgenstrukturanalyse dieses 0.08 nm Inhibitors zeigt die Verdrängung eines ungünstig gebundenen Wassermoleküls in der S1-Tasche durch die *p*-Methoxygruppe. Das Pyrazol-N2-Stickstoffatom wechselwirkt mit dem Rückgrat von Gln192 und das Carbonylsauerstoffatom des Carboxamids mit der NH-Einheit von Gly216. Die Orientierung des Lactam-Phenyl-Restes in der S4-Tasche zeigt eine Kante-zu-Fläche-Wechselwirkung mit Trp215.^[55]

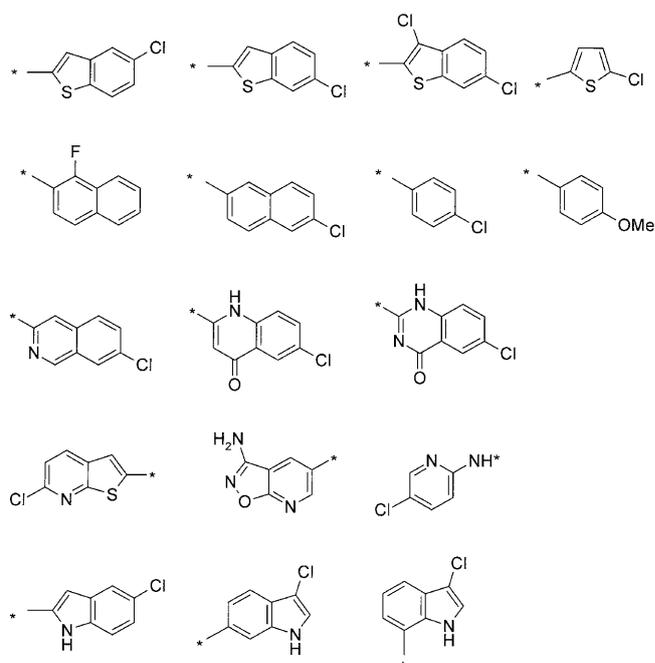
Die Entwicklung neuer Faktor-Xa-Inhibitoren bleibt nicht stehen: Vor kurzem wurde mit dem Triazolionphenylrest eine neue P1-Gruppe eingeführt,^[56] die eigentlich zu groß für die S1-Tasche ist. Die Kristallstruktur von FXa mit dem von 38 abgeleiteten Inhibitor 39 zeigt aber, dass der Asp189-Rest in diesem Fall aus seiner normalen Lage herausgedreht ist und so eine größere Tasche zur Aufnahme des Triazolionphenylrestes freigibt. Die Carbonylgruppe der Triazolioneinheit bildet eine über ein Wassermolekül vermittelte H-Brücke zur Asp189-Carboxylatgruppe. Eine weitere H-Brücke zu dem anderen Carboxylatsauerstoffatom wird ebenfalls über ein Wassermolekül vermittelt und geht von einem Triazolion-N-Atom aus. Die andere Triazolion-NH-Einheit bildet eine H-Brücke zu Gly218. Die Verbindung ist selektiv, denn in der S1-Tasche von Thrombin „wehrt“ sich die Asp189-Seitenkette gegen das Zurückdrücken aufgrund einer elektrostatischen Abstoßung zum Asp221; Faktor Xa enthält an dieser Position nur ein ungeladenes Ala221.

Viele FXa-Inhibitoren setzen sich aus drei Pharmakophoren zusammen: dem P1-Rest, dem P4-Rest und einem Kernteil. Häufig genutzte Pharmakophore seien im Folgenden aufgezählt:

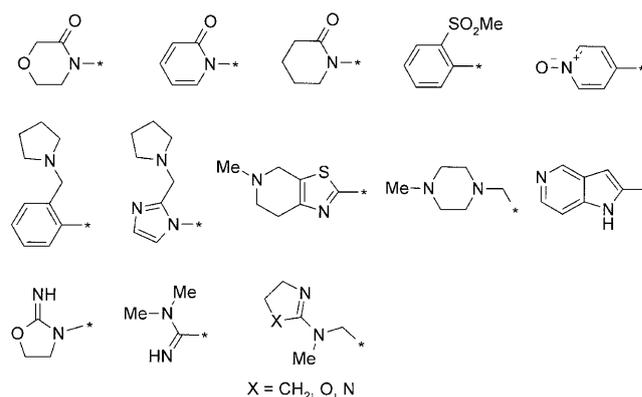
Bevorzugte nichtbasische P1-Bausteine sind Chlorthiophen, Chlorbenzothiophen, Chlorbenzol, Chlornaphthalin, 4-Methoxybenzol, Chlorisochinolin^[57] und Chlorindol (Schema 15).^[49]

Die lipophile S4-Tasche wird bevorzugt adressiert von substituierten Heterocyclen, die zusätzlich auch eine positive Ladung beherbergen können, um mit dem „Kationenloch“ zu wechselwirken (Schema 16). Infrage kommen hierfür z.B. Methylsulfonylbenzol (DPC423), Pyridin-*N*-oxid (Otamixaban), Pyridine, Pyrrolopyridine,^[58] Tetrahydro-5-methylthiazolo[5,4-*c*]pyridin (Edoxaban), Pyrazole und Imidazole sowie nichtaromatische Amide, Lactame (Apixaban), Morpholinone (Rivaroxaban), Pyridone (Eribaxaban), cyclische Amine,^[59] Methylpiperazin,^[60] Methylaminoxazoline und -imidazole,^[61] Oxazolidinimine, Amidine (Betrixaban)^[62] und Guanidine.

Es konnte gezeigt werden, dass die stufenweise Methylierung einer terminalen P4-Aminoalkylgruppe zu einer Zunahme der Kation- π -Wechselwirkung zu den aromatischen Aminosäureseitenketten in der aromatischen S4-Tasche führt, wobei das tertiäre und das quartäre Ammoniumion zusätzlich von wegfallenden Desolvatisierungsenergien profitieren.^[63] Dies erklärt auch, weshalb in der Reihe von Razaxabanderivaten 37 (Schema 14) der K_i -Wert für FXa in der Reihe 2-PhCH₂NH₂ ($K_i=2.0$ nM) > 2-PhCH₂NMe₂ ($K_i=0.2$ nM) > 2-



Schema 15. Bevorzugte nichtbasische oder schwach basische P1-Bausteine bei FXa-Inhibitoren.



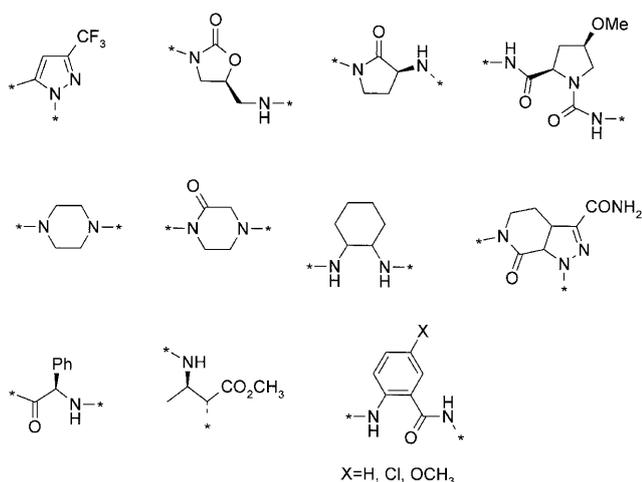
Schema 16. Bevorzugte P4-Bausteine bei FXa-Inhibitoren.

Ph-CH₂-N⁺Me₃Br⁻ ($K_i=0.05$ nM) abnimmt, die Absorption durch die Darmwand sich aber verschlechtert.^[64]

Für den Mittelteil (Schema 17), an den die P1- und P4-Reste gebunden sind, werden Bausteine wie Oxazolidinone, Anthranilamide, cyclische Diamine, Indazole, Pyrazole, Piperazinone und Indole beschrieben. Die Bindung zu den P1- und P4-Resten erfolgt über Methylene-, Amid- oder Sulfonamidbindungen, wobei zu den P4-Resten häufig eine Phenylen-, Chlorthienylen- oder Piperidinylbrücke zwischengeschaltet ist.

5. Duale Thrombin/Faktor-Xa-Inhibitoren

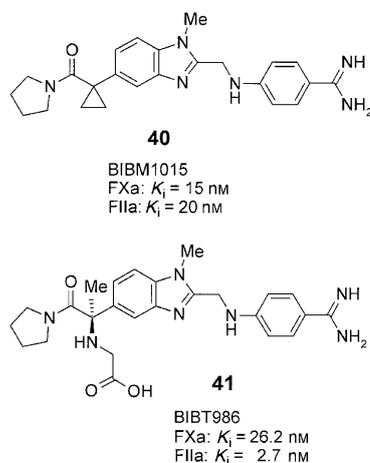
Kombiniert man einen Thrombin- und einen Faktor-Xa-Inhibitor in einer jeweils für einen antithrombotischen Effekt unterschwelligen Dosierung, so findet man in Thrombose-



Schema 17. Bevorzugte Kernbausteine bei FXa-Inhibitoren.

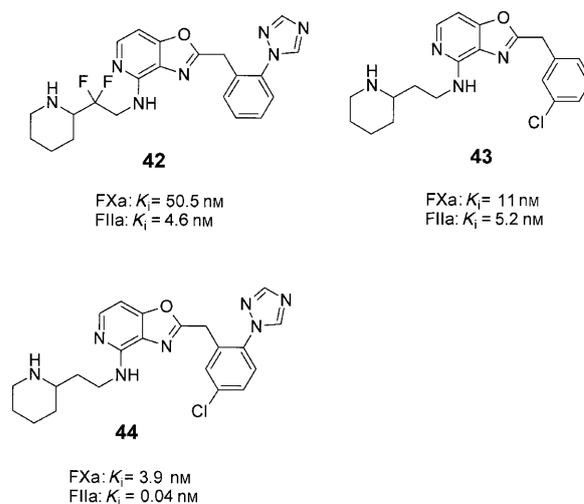
modellen, dass die direkte Inhibierung beider Targets zugleich nicht nur einen additiven, sondern sogar einen synergistischen antithrombotischen Effekt ergibt.^[65,66] Diese Befunde lassen hoffen, dass eine duale Therapie ein größeres therapeutisches Fenster aufweisen könnte. Die niedrigere Dosierung führt zu weniger unerwünschten Nebenwirkungen (wie Blutungen), liefert dabei aber wegen des Synergismus schon den gewünschten antithrombotischen Effekt. Aus diesem Grunde haben mehrere Gruppen begonnen, auch nach dualen Inhibitoren zu suchen.^[67]

Boehringer Ingelheim berichtete 2001, dass die 1-Methylbenzimidazoleinheit einer Reihe ihrer Inhibitoren in der Lage ist, sowohl die kleine, für Lösungsmittel zugängliche Tasche in Faktor Xa wie auch die größere, hydrophobe S2-Tasche in Thrombin auszufüllen.^[68] Einer der potentesten dualen Inhibitoren ist hierbei BIBM1015 (**40**; Schema 18). Ein anderes Derivat aus dieser Serie, BIBT986 (**41**, Tanogitrin),^[69] wurde in die klinische Entwicklung genommen und im Menschen erfolgreich in einem Modell zur Endotoxin-induzierten Koagulation untersucht,^[70] über eine weitere Entwicklung dieser Verbindung wurde aber seither nicht berichtet.



Schema 18. Duale Thrombin/FXa-Inhibitoren von Boehringer Ingelheim.

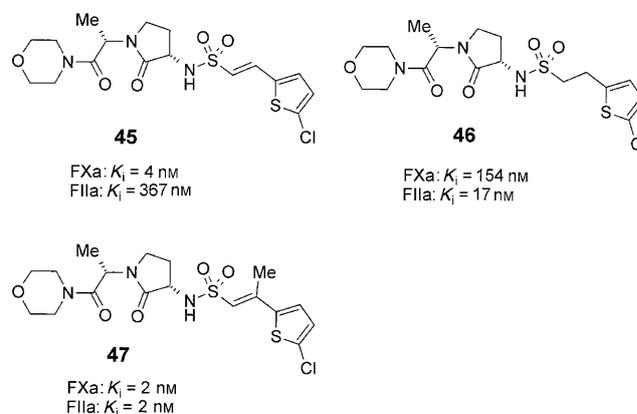
Merck (US) berichtete 2004 über eine neue Serie von Oxazolopyridinen (**42–44**; Schema 19), deren Optimierung



Schema 19. Duale Thrombin/FXa-Inhibitoren von Merck (US).

im Laufe des Projektes auch zu dualen Inhibitoren führte.^[71] Hierbei wechselwirkt das Triazolyl- und/oder Chlor-substituierte Aren mit der S1-Tasche, das Oxazolopyridin mit der S2- und die Piperidylgruppe mit der S3-Tasche. Die exocyclische NH-Gruppe und das Stickstoffatom des Oxazolrings gehen beide eine Wasserstoffbrücke mit Gly216 ein, während das Stickstoffatom der P3-Piperidineinheit eine intramolekulare Wasserstoffbrücke mit dem Aminopyridinring-Stickstoffatom bildet. **44** war der potenteste Inhibitor, zeigte aber eine nur sehr geringe Bioverfügbarkeit von < 1%.

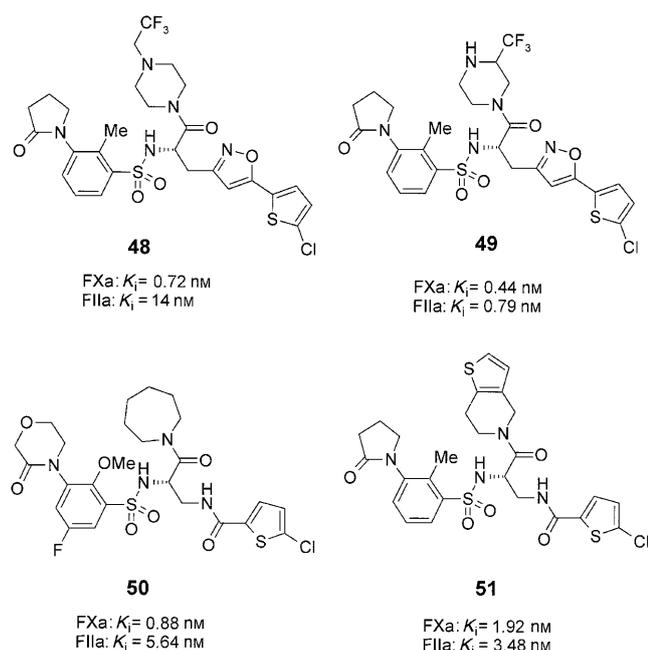
Geringe Variationen im P1-Teil des Faktor-Xa-Inhibitors **45** von GlaxoSmithKline führten zum gesättigten **46**, das eine stärkere Thrombin- als Faktor-Xa-Komponente aufweist, und zu **47** mit einer zusätzlichen Methylgruppe an der Doppelbindung, die überraschenderweise ein potenter, dualer Inhibitor ist (Schema 20).^[72] Alle drei Verbindungen binden auf ähnliche Weise an Thrombin: Die Chlorthienylgruppe fungiert als S1-Binder, die Carbonylgruppe des Pyrrolidins wechselwirkt mit dem Proteinrückgrat, und der Morpholin-



Schema 20. Duale Thrombin/FXa-Inhibitoren von GlaxoSmithKline.

ring besetzt die S2-Tasche, wobei die S3- und S4-Taschen unbesetzt bleiben. Im Fall der Bindung an Faktor Xa gehen die Chlorthienylgruppe und die Carbonylgruppe des Pyrrolidins zwar analoge Wechselwirkungen ein, anders als im Fall von Thrombin ist die Alanylamidgruppe der Morpholineinheit aller drei Verbindungen aber in der S4-Tasche lokalisiert. Die Unterschiede in den Inhibitorprofilen der drei Verbindungen sind auf verschiedene Konformationen des jeweiligen Sulfonamids zurückzuführen.

Eine Reihe weiterer sehr potenter, dualer Thrombin/Faktor-Xa-Inhibitoren wie **48–51** von Sanofi-Aventis wurden 2009 offengelegt (Schema 21),^[73,74] es liegen jedoch keine Informationen über eine weitere Entwicklung dieser Verbindungsklasse vor.



Schema 21. Duale Thrombin/FXa-Inhibitoren von Sanofi-Aventis.

6. Vergleichende Betrachtung der Wirkstoffentwicklungen von FIIa- und von FXa-Inhibitoren

Weshalb gelangte die pharmazeutische Industrie trotz des späteren Einstieges bei FXa-Inhibitoren schneller zum Erfolg als bei Thrombin-Inhibitoren?

Zur Beantwortung dieser Frage ist es sinnvoll, die Bindungstaschen dieser beiden eng miteinander verwandten Enzyme im Detail zu analysieren. Im Sequenzabgleich der Proteasedomänen wichtiger, an der Blutgerinnung beteiligter Serinproteasen (Abbildung 1) erkennt man, dass Thrombin und FXa eine Sequenzidentität von 37% aufweisen und Thrombin im Bereich der Aminosäuren in Position 60 eine größere Schleife aufweist als alle anderen Proteasen. Dies führt in der Substratbindungstasche zu einer großen, vorwiegend lipophil gestalteten S2-Tasche. Die S1-Tasche ist äußerst ähnlich zu jener von FXa. Die Aminosäuren der Position 227 (Thrombin: Phe227, FXa: Ile227) sind unterschiedlich – da sie ins Proteininnere zeigen, hat dies aber

keine größeren Auswirkungen auf die Gestalt der S1-Oberfläche. Außerdem ist am Ausgang der S1-Tasche Thrombin-Glu192 gegen FXa-Gln192 ausgetauscht. Meist erweisen sich diese Aminosäuren als sehr flexibel und sind daher selten in Inhibitor-Protein-Wechselwirkungen einbezogen. Signifikante Unterschiede ergeben sich allerdings im Bereich der S4-Tasche: Diese wird bei FXa von zwei aromatischen Aminosäuren (Tyr99, Phe174) begrenzt, wogegen Thrombin dort ein Ile und Leu enthält. Der Grund der S4-Tasche wird in beiden Proteinen durch ein Trp215 gebildet. Weitere Unterschiede sind auch in der S3-Tasche zu erkennen: Diese formt bei beiden Proteasen nur eine flache Delle an der Proteinoberfläche. Bei Thrombin bestehen aber Wechselwirkungsmöglichkeiten von polaren Seitenketten mit Thr172 in der S3-Tasche, während bei FXa das entsprechende Ser172 vom größeren Phe174 abgeschirmt ist.

Thrombin hat bis auf die tiefe S1-Tasche eine flache, eher lipophil geprägte Substratbindungsstelle, wogegen FXa mit den beiden aromatischen Aminosäuren in der S4-Tasche eine tiefere Inhibitor-Bindungsstelle bildet. Den Durchbruch zu Inhibitoren mit sehr guten pharmakokinetischen Eigenschaften brachte im Falle von FXa der Ersatz von polaren P1-Gruppen durch lipophile Substituenten (z. B. eine Chlorthienylgruppe). Durch eine flache P4-Gruppe mit π -Elektronen kommt man insgesamt zu sehr potenten (subnanomolaren) Inhibitoren mit ausgewogenen Lipophilie-Eigenschaften. Die hohe Affinität der bislang auf den Markt gelangten Thrombin-Inhibitoren resultiert aus ionischen Wechselwirkungen mit der S1- und der S3-Tasche sowie lipophilen Kontakten mit der S2- und S4-Tasche. Solche Verbindungen sind geladen und haben ein relativ hohes Molekulargewicht, was sich in einer mäßigen Pharmakokinetik widerspiegelt. Wie bei Faktor-Xa-Inhibitoren kann auch bei Thrombin-Inhibitoren wegen der großen Ähnlichkeit ihrer S1-Tasche mit der von FXa der Chlorthienylrest als P1-Gruppe verwendet werden. Die S4-Tasche von Thrombin liefert, anders als diejenige von FXa, wegen der fehlenden aromatischen Aminosäuren und ihres flacheren Charakters nur einen begrenzten energetischen Beitrag zur Wechselwirkung mit Inhibitoren. Zusätzliche Bindungsenergie ist bei Thrombin in der S2-Tasche also nur durch lipophile P2-Gruppen zu erlangen. Derartige hoch lipophile Verbindungen konnten bisher allerdings nicht für die Anwendung am Menschen optimiert werden.

Fassen wir zusammen: Obwohl FXa und Thrombin einander sehr ähnlich sind, entscheiden die kleinen Unterschiede in den Bindungstaschen über die Erfolgsaussichten der Inhibitoroptimierung. Dies ist der Grund dafür, dass es viel schwieriger ist, Thrombin-Inhibitoren zu finden, die gleichzeitig eine hohe Bindungsaffinität und vorteilhafte pharmakokinetische Eigenschaften haben sollen.

Eingegangen am 26. Juli 2010

- [1] J. A. López, J. Chen, *Thromb. Res.* **2009**, 123 Suppl. 4, S30–S34.
- [2] Y. Nakamura, K. Nakamura, K. Fukushima-Kusano, K. Ohta, H. Matsubara, T. Hamuro, C. Yutani, T. Ohe, *Thromb. Res.* **2003**, 111, 137–142.
- [3] M. Petitou, C. A. A. van Boeckel, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 3180–3196; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3118–3133.

- [4] D. Kubitz, S. Haas, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2006**, *15*, 843–855.
- [5] J. Dodt, H.-P. Müller, U. Seemüller, J.-Y. Chang, *FEBS Lett.* **1984**, *165*, 180–184.
- [6] F. Markwardt, *Naturwissenschaften* **1955**, *42*, 537–538.
- [7] P. Walsmann, F. Markwardt, *Pharmazie* **1981**, *36*, 653–660.
- [8] J. M. Maraganore, P. Bourdon, J. Jablonski, K. L. Ramachandran, J. W. Fenton, *Biochemistry* **1990**, *29*, 7095–7101.
- [9] J. Stürzebecher, F. Markwardt, B. Voigt, G. Wagner, P. Walsmann, *Thromb. Res.* **1983**, *29*, 635–642.
- [10] R. Kikumoto, Y. Tamao, T. Tezuka, S. Tonomura, H. Hara, K. Ninomiya, A. Hijikata, S. Okamoto, *Biochemistry* **1984**, *23*, 85–90.
- [11] S. Sherry, N. Alkjaersig, A. P. Fletcher, *Am. J. Physiol.* **1965**, *209*, 577–583.
- [12] a) D. Banner, P. Hadvary, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 20085–20093; b) H. Brandstetter, D. Turk, H. W. Hoeffken, D. Grosse, J. Stürzebecher, P. D. Martin, B. F. P. Edwards, W. Bode, *J. Mol. Biol.* **1992**, *226*, 1085–1099.
- [13] a) W. Bode, R. Huber, T. J. Rydel, A. Tulinsky in *Thrombin structure and function* (Hrsg.: L. J. Berliner), Plenum, New York, **1992**, S. 3–61; b) D. W. Banner, P. Hadvary, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1993**, *340*, 27–33.
- [14] a) C. Kettner, E. Shaw, *Thromb. Res.* **1979**, *14*, 969–973; b) B. Walker, P. Wikstom, E. Shaw, *Biochem. J.* **1985**, *230*, 645–650.
- [15] W. Bode, I. Mayr, U. Baumann, R. Huber, S. R. Stone, J. Hofsteenge, *EMBO J.* **1989**, *8*, 3467–3475.
- [16] S. Bajusz, E. Széll, E. Barabás, D. Bagdy, Z. Mohai (Richter, Gedeon, Vegyeszeti Gyar Rt., Ungarn), US 4,346,078, **1982**.
- [17] U. G. Eriksson, U. Bredberg, K.-J. Hoffmann, A. Thuresson, M. Gabriellsson, H. Ericsson, M. Ahnoff, K. Gislen, G. Fager, D. Gustafsson, *Drug Metab. Dispos.* **2003**, *31*, 294–305.
- [18] D. Gustafsson, J.-E. Nyström, S. Carlsson, U. Bredberg, U. Eriksson, E. Gyzander, M. Elg, T. Antonsson, K.-J. Hoffmann, A.-L. Ungell, H. Sörensen, S. Någård, A. Abrahamsson, R. Bylund, *Thromb. Res.* **2001**, *101*, 171–181.
- [19] L. A. Sorbera, J. Bozzo, J. Castaner, *Drugs Future* **2005**, *30*, 877–885.
- [20] N. H. Huel, H. Nar, H. Priepke, U. J. Ries, J.-M. Stassen, W. Wienen, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1757–1766.
- [21] S. Blech, T. Ebner, E. Ludwig-Schwelling, J. Stangier, W. Roth, *Drug Metab. Dispos.* **2008**, *36*, 386–399.
- [22] S. B. Olsson, L. H. Rasmussen, A. Tveit, E. Jensen, P. Wessman, S. Panfilov, K. Wähländer, *Thromb. Haemostasis* **2010**, *103*, 604–612.
- [23] S. J. Johansson, M. Cullberg, A. Ekdahl, K. Wähländer, K. Duner, U. G. Eriksson, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2009**, *105* (Suppl. 1), ABST P78.
- [24] a) M. Nakajima, M. Suga, K. Sugawara, K. Katsu, S. Yuki, J. Anabuki, T. Yamamoto, Y. Abe, Y. Kitada, *J. Thromb. Haemostasis* **2007**, *5* Supplement 2: P-T-643; b) M. Nakajima, M. Suga, K. Sugawara, K. Yamada, J. Anabuki, T. Yamamoto, Y. Kitada, *J. Thromb. Haemostasis* **2007**, *5* Supplement 2: P-T-644.
- [25] T. Lu, T. Markotan, S. K. Ballentine, E. C. Giardino, J. Spurlino, K. Brown, B. E. Maryanoff, B. E. Tomczuk, B. P. Damiano, U. Shukla, D. End, P. Andrade-Gordon, R. F. Bone, M. R. Player, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1843–1856.
- [26] J. A. Olsen, D. W. Banner, P. Seiler, B. Wagner, T. Tschopp, U. Obst-Sander, M. Kansy, K. Müller, F. Diederich, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 666–675.
- [27] a) C. Tapparelli, R. Metternich, C. Ehrhardt, M. Zurini, G. Claeson, M. F. Scully, S. R. Stone, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 4734–4741; b) G. Claeson, M. Philipp, E. Agner, M. F. Scully, R. Metternich, V. V. Kakkar, T. DeSoyza, L.-H. Niu, *Biochem. J.* **1993**, *296*, 309–312.
- [28] a) W. C. Lumma, Jr., K. M. Witherup, T. J. Tucker, S. F. Brady, J. T. Sisko, A. M. Naylor-Olsen, S. D. Lewis, B. J. Lucas, J. P. Vacca, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1011–1013; b) T. J. Tucker, S. F. Brady, W. C. Lumma, S. D. Lewis, S. J. Gardell, A. M. Naylor-Olsen, Y. Yan, J. T. Sisko, K. J. Stauffer, B. J. Lucas, J. J. Lynch, J. J. Cook, M. T. Stranieri, M. A. Holahan, E. A. Lyle, E. P. Baskin, I. W. Chen, K. B. Dancheck, J. A. Krüger, C. M. Cooper, J. P. Vacca, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3210–3219.
- [29] C. S. Burgey, K. A. Robinson, T. A. Lyle, P. G. Natemet, H. G. Selnick, R. C. Isaacs, S. D. Lewis, B. J. Lucas, J. A. Krüger, R. Singh, C. Miller-Stein, R. B. White, B. Wong, E. A. Lyle, M. T. Stranieri, J. J. Cook, D. R. McMasters, J. M. Pellicore, S. Pal, A. A. Wallace, F. C. Clayton, D. Bohn, D. C. Welsh, J. J. Lynch, Jr., Y. Yan, Z. Chen, L. Kuo, S. J. Gardell, J. A. Shafer, J. P. Vacca, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1353–1357.
- [30] J. Brånalt, D. Gustafsson, I. Nilsson, M. Polla, (AstraZeneca AB), WO 2009/004383, **2009**.
- [31] J. Brånalt, D. Gustafsson, I. Nilsson, M. Polla, (AstraZeneca AB), WO 2009/157860, **2009**.
- [32] B. Kaiser, *Drugs Future* **1998**, *23*, 423–436.
- [33] Aktuelle Übersichten: a) A. Straub, S. Roehrig, A. Hillisch, *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 257–269; b) D. J. P. Pinto, J. M. Smallheer, D. L. Cheney, R. M. Knabb, R. R. Wexler, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6243–6274.
- [34] B.-J. Zhu, R. M. Scarborough, *Curr. Opin. Cardiovasc. Pulm. Renal Invest. Drugs* **1999**, *1*, 63–87, zit. Lit.
- [35] a) T. Nagahara, N. Kanaya, K. Inamura, Y. Yokoyama, EP 540051, **1993**; b) T. Nagahara, Y. Yokoyama, K. Inamura, S.-I. Katakura, S. Komoriya, H. Yamaguchi, T. Hara, M. Iwamoto, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1200–1207.
- [36] L. Peterlin Masic, *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 3627–3648.
- [37] A. W. Faull, C. M. Mayo, J. Preston, A. Stocker (Zeneca Limited, Großbritannien), WO 96/10022, **1996**.
- [38] M. T. Stubbs, S. Reyda, F. Dullweber, M. Möller, G. Klebe, D. Dorsch, D. W. W. K. R. Mederski, H. Wurziger, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 246–249.
- [39] N. Haginoya, S. Kobayashi, S. Komoriya, T. Yoshino, M. Suzuki, T. Shimada, K. Watanabe, Y. Hirokawa, T. Furugori, T. Nagahara, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5167–5182.
- [40] T. Fujimoto, Y. Imaeda, N. Konishi, K. Hiroe, M. Kawamura, G. P. Textor, K. Aertgeerts, K. Kubo, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3517–3531.
- [41] R. J. Young, M. Campbell, A. D. Borthwick, D. Brown, C. L. Burns-Kurtis, C. Chan, M. A. Convery, M. C. Crowe, S. Dayal, H. Diallo, H. A. Kelly, N. P. King, S. Kleanthous, A. M. Mason, J. E. Mordaunt, C. Patel, A. J. Pateman, S. Senger, G. P. Shah, P. W. Smith, N. S. Watson, H. E. Weston, P. Zhou, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5953–5957.
- [42] C. Bissantz, B. Kuhn, M. Stahl, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5061–5084.
- [43] J. T. Kohrt, C. F. Bigge, J. W. Bryant, A. Casimiro-Garcia, L. Chi, W. L. Cody, T. Dahring, D. A. Dudley, K. J. Filipinski, S. Haarer, R. Heemstra, N. Janiczek, L. Narasimhan, T. McClanahan, J. T. Peterson, V. I. Sahasrabudhe, R. Schaum, C. A. Van Huis, K. M. Welch, E. Zhang, R. J. Leadley, J. J. Edmunds, *Chem. Biol. Drug Des.* **2007**, *70*, 100–112.
- [44] P. Zhang, L. Bao, J. Fan, Z. J. Jia, U. Sinha, P. W. Wong, G. Park, A. Hutchaleelaha, R. M. Scarborough, B.-Y. Zhu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2186–2189.
- [45] B.-Y. Zhu, Z. J. Jia, P. Zhang, T. Su, W. Huang, E. Goldman, D. Tumas, V. Kadambi, P. Eddy, U. Sinha, R. M. Scarborough, Y. Song, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5507–5512.
- [46] T. Ohta, S. Komoriya, T. Yoshino, K. Uoto, Y. Nakamoto, H. Naito, A. Mochizuki, T. Nagata, H. Kanno, N. Haginoya, K. Yoshikawa, M. Nagamochi, S. Kobayashi, M. Ono, (Daichi Sankyo Co Ltd.), WO 2003/016302, **2003**; WO 2004/058715, **2004**; WO 2003/000680, **2003**.

- [47] T. Furugohri, K. Isobe, Y. Honda, C. Kamisato-Matsumoto, N. Sugiyama, T. Nagahara, Y. Morishima, T. Shibano, *J. Thromb. Haemostasis* **2008**, *6*, 1542–1549.
- [48] Daiichi Files For Approval Of Blood Clot Drug, The Wall Street Journal (Online and Print), 06. April 2010.
- [49] a) T. Nagata, T. Yoshino, N. Haginoya, K. Yoshikawa, M. Nagamochi, S. Kobayashi, S. Komoriya, A. Yokomizo, R. Muto, M. Yamaguchi, K. Osanai, M. Suzuki, H. Kanno, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1193–1206; b) K. Yoshikawa, A. Yokomizo, H. Naito, N. Haginoya, S. Kobayashi, T. Yoshino, T. Nagata, A. Mochizuki, K. Osanai, K. Watanabe, H. Kanno, T. Ohta, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 8206–8220; c) K. Yoshikawa, S. Kobayashi, Y. Nakamoto, N. Haginoya, S. Komoriya, T. Yoshino, T. Nagata, A. Mochizuki, K. Watanabe, M. Suzuki, H. Kanno, T. Ohta, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 8221–8233.
- [50] K. R. Guertin, Y.-M. Choi, *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 2471–2481.
- [51] S. Roehrig, A. Straub, J. Pohlmann, T. Lampe, S. Pernerstorfer, K.-H. Schlemmer, P. Reinemer, E. Perzborn, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5900–5908.
- [52] W. W. K. R. Mederski, B. Cezanne, C. van Amsterdam, K.-U. Bühring, D. Dorsch, J. Gleitz, J. März, C. Tsaklakidis, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5817–5822.
- [53] M. L. Quan, P. Y. S. Lam, Q. Han, D. J. P. Pinto, M. Y. He, E. Renhua, D. Christopher, C. G. Clark, C. A. Teleha, J.-H. Sun, R. S. Alexander, S. Bai, J. M. Luetzgen, R. M. Knabb, P. C. Wong, R. R. Wexler, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1729–1744.
- [54] a) A. E. Mutlib, J. Shockcor, S.-Y. Chen, R. J. Espina, D. J. Pinto, M. J. Orwat, S. R. Prakash, L.-S. Gan, *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 48–62; b) A. E. Mutlib, S.-Y. Chen, R. J. Espina, J. Shockcor, S. R. Prakash, L.-S. Gan, *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 63–75.
- [55] D. J. P. Pinto, M. J. Orwat, S. Koch, K. A. Rossi, R. S. Alexander, A. Smallwood, P. C. Wong, A. R. Rendina, J. M. Luetzgen, R. M. Knabb, K. He, B. Xin, R. R. Wexler, P. Y. S. Lam, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5339–5356.
- [56] M. L. Quan, D. J. P. Pinto, K. A. Rossi, S. Sheriff, R. S. Alexander, E. Amparo, K. Kish, R. M. Knabb, J. M. Luetzgen, P. Morin, A. Smallwood, F. J. Woerner, R. R. Wexler, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1373–1377.
- [57] K. Yoshikawa, S. Kobayashi, Y. Nakamoto, N. Haginoya, S. Komoriya, T. Yoshino, T. Nagata, A. Mochizuki, K. Watanabe, M. Suzuki, H. Kanno, T. Ohta, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 8221–8233.
- [58] Y. M. Choi-Sledeski, R. Kearney, G. Poli, H. Pauls, C. Gardner, Y. Gong, M. Becker, R. Davis, A. Spada, G. Liang, V. Chu, K. Brown, D. Collussi, R. Leadley, Jr., S. Rebello, P. Moxey, S. Morgan, R. Bentley, C. Kasiewski, S. Maignan, J.-P. Guilloteau, V. Mikol, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 681–684.
- [59] Wie Lit. [39].
- [60] M. J. Kochanny, M. Adler, J. Ewing, B. D. Griedel, E. Ho, R. Karanjawala, W. Lee, D. Lentz, A. M. Liang, M. M. Morrissey, G. B. Phillips, J. Post, K. L. Sacchi, S. T. Sakata, B. Subramanyam, R. Vergona, J. Walters, K. A. White, M. Whitlow, B. Ye, Z. Zhao, K. J. Shaw, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2127–2146.
- [61] B. Ye, D. O. Arnaiz, Y.-L. Chou, B. D. Griedel, R. Karanjawala, W. Lee, M. M. Morrissey, K. L. Sacchi, S. T. Sakata, K. J. Shaw, S. C. Wu, Z. Zhao, M. Adler, S. Cheeseman, W. P. Dole, J. Ewing, R. Fitch, D. Lentz, A. Liang, D. Light, J. Morser, J. Post, G. Rumennik, B. Subramanyam, M. E. Sullivan, R. Vergona, J. Walters, Y.-X. Wang, K. A. White, M. Whitlow, M. J. Kochanny, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2967–2980.
- [62] P. Zhang, W. Huang, L. Wang, L. Bao, Z. J. Jia, S. M. Bauer, E. A. Goldman, G. D. Probst, Y. Song, T. Su, J. Fan, Y. Wu, W. Li, J. Woolfrey, U. Sinha, P. W. Wong, S. T. Edwards, A. E. Arfsten, L. A. Clizbe, J. Kanter, A. Pandey, G. Park, A. Hutchaleelaha, J. L. Lambing, S. J. Hollenbach, R. M. Scarborough, B.-Y. Zhu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2179–2185.
- [63] L. M. Salonen, C. Bucher, D. W. Banner, W. Haap, J.-L. Mary, J. Benz, O. Kuster, P. Seiler, W. B. Schweizer, F. Diederich, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 825–828; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 811–814.
- [64] M. L. Quan, Q. Han, J. M. Fevig, P. Y. S. Lam, S. Bai, R. M. Knabb, J. M. Luetzgen, P. C. Wong, R. R. Wexler, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1795–1798.
- [65] W. R. Gould, T. B. McClanahan, K. M. Welch, S. M. Baxi, K. Saiya-Cork, L. Chi, T. R. Johnson, R. J. Leadley, *J. Thromb. Haemostasis* **2006**, *4*, 834–841.
- [66] E. C. Giardino, B. J. Haertlein, L. de Garavilla, M. J. Costanzo, B. P. Damiano, P. Andrade-Gordon, B. E. Maryanoff, *Blood Coagulation Fibrinolysis* **2010**, *21*, 128–134.
- [67] A. Kranjc, D. Kikelj, *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 2535–2547.
- [68] H. Nar, M. Bauer, A. Schmid, J.-M. Stassen, W. Wienen, H. M. W. Priepke, I. K. Kauffmann, U. J. Ries, N. H. Hael, *Structure* **2001**, *9*, 29–37.
- [69] a) E. U. Graefe-Mody, U. Schühly, K. Rathgen, H. Stähle, J. M. Leitner, B. Jilma, *J. Thromb. Haemostasis* **2006**, *4*, 1502–1509; b) U. J. Ries, *Abstr. Pap. 226th ACS National Meeting (New York, NY)*, **2003**, MEDI-033.
- [70] J. M. Leitner, B. Jilma, F. B. Mayr, F. Cardona, A. O. Spiel, C. Firbas, K. Rathgen, H. Stähle, U. Schühly, E. U. Graefe-Mody, *Clin. Pharmacol. Ther.* **2007**, *81*, 858–866.
- [71] a) J. Z. Deng, D. R. McMasters, P. M. A. Rabbat, P. D. Williams, C. A. Coburn, Y. Yan, L. C. Kuo, S. D. Lewis, B. J. Lucas, J. A. Krueger, B. Strulovici, J. P. Vacca, T. A. Lyle, C. S. Burgey, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4411–4416; b) J. Z. Deng, C. S. Burgey, R. M. A. Rabbat, S. D. Lewis, B. J. Lucas, J. A. Krueger, R. B. White, B. Wong, E. A. Lyle, D. R. McMasters, *Abstr. Pap. 227th ACS National Meeting (Anaheim, USA)*, **2004**, MEDI-095.
- [72] R. J. Young, D. Brown, C. L. Burns-Kurtis, C. Chan, M. A. Convery, J. A. Hubbard, H. A. Kelly, A. J. Pateman, A. Patikis, S. Senger, G. P. Shah, J. R. Toomey, N. S. Watson, P. Zhou, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2927–2930.
- [73] M. Follmann, V. Wehner, J.-M. Altenburger, G. Lassalle, J.-P. Haurault (Sanofi-Aventis Fr.), WO 2009/103439, **2009**.
- [74] M. Follmann, V. Wehner, J. Meneyrol, J.-M. Altenburger, F. Petit, G. Lassalle, J.-P. Haurault (Sanofi-Aventis Fr.), WO 2009/103440, **2009**.