

**Optimierung synthetischer Inhibitoren
des Gerinnungsfaktors Xa
vom 4-Amidinobenzylamid-Typ**



Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Anne Stürzebecher

aus Erfurt

Marburg/Lahn 2005

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation angenommen am: 18.11.2005

Erstgutachter: Dr. habil. Torsten Steinmetzer
Zweitgutachter: Prof. Dr. Gerhard Klebe

Tag der mündlichen Prüfung am: 21.11.2005

Inhaltsverzeichnis

<u>1. Einleitung</u>	1
1.1. Das Blutgerinnungssystem	1
1.2. Blutgerinnungsstörungen	6
1.3. Konventionelle antithrombotische Therapie	7
1.3.1. Thrombozytenaggregationshemmer	7
1.3.2. Antikoagulantien	8
1.3.3. indirekte Fibrinolytika (Thrombolytika)	11
1.4. Das ideale Antithrombotikum	11
1.5. Alternative Antikoagulantien - Hemmstoffe der Gerinnungsproteasen	12
1.5.1. Thrombinhemmung	12
1.5.2. TF/VIIa-Hemmung	14
1.5.3. Faktor Xa-Hemmung	15
1.6. Strukturelle Grundlagen	22
1.6.1. Bekannte Ausgangsverbindungen	22
1.7. Zielsetzung	25
<u>2. Ergebnisse</u>	26
2.1. Synthesen	26
2.1.1. Synthese von Verbindungen mit substituierten Benzylsulfonylresten	31
2.1.2. Synthese von Verbindungen mit Pyridylmethylsulfonylresten	32
2.1.3. Synthese des Prodrugs 771	32
2.1.4. Synthese und Racemattrennung der D,L-Homopyridylalanine	32
2.1.5. Synthese der Pyridyl-N-Oxid-Derivate	34
2.1.6. Synthese der Prodrugs 1715 und 1331	35
2.2. Enzymkinetische Messungen und Untersuchung des Eliminationsverhaltens	36
2.2.1. Inhibitoren ohne Sulfonylfunktion	36
2.2.2. Inhibitoren mit Derivaten des D-Phenylalanins	38
2.2.3. Inhibitoren mit D-Homophenylalanin	38
2.2.4. Inhibitoren mit D-Homotyrosin	45
2.2.5. Inhibitoren mit D,L-Homopyridylalaninen	49

2.2.6. Inhibitoren mit Pyridyl-N-Oxiden in P4-Position	56
2.2.7. Inhibitoren mit Pyridyl-N-Oxiden in P3-Position	57
2.2.8. Inhibitoren zur Hemmung der Blutgerinnung	61
2.3. Genauere Charakterisierung ausgewählter Hemmstoffe	63
2.3.1. Bestimmung der Hemmwirkung auf den Prothrombinasekomplex	64
2.3.2. Bestimmung der Hemmwirkung auf die Thrombinbildung	64
2.3.3. Bestimmung der gerinnungshemmenden Wirksamkeit <i>in vitro</i>	67
2.3.4. Bestimmung der antithrombotischen Wirksamkeit <i>in vivo</i>	68
<u>3. Diskussion</u>	71
3.1. FXa-Hemmstoffe als Antithrombotika	71
3.2. Synthesestrategie	71
3.3. Eigenschaften der Inhibitoren	73
3.4. Struktur-Wirkungs-Beziehungen	75
3.4.1. Struktur des FXa und Bindungsmodus substratanaloger Hemmstoffe	76
3.4.2. Affinität und Selektivität	78
3.4.3. Pharmakokinetik	84
3.4.4. Gerinnungshemmende Wirksamkeit	88
<u>4. Zusammenfassung und Ausblick</u>	90
<u>5. Experimenteller Teil</u>	94
5.1. Materialien und Methoden zur Synthese und analytischen Charakterisierung	94
5.2. Enzymkinetische Messungen	96
5.2.1. Bestimmung der Hemmkonstanten	96
5.2.2. Hemmung des Prothrombinasekomplexes	98
5.3. Hemmung der Thrombinbildung	98
5.4. Pharmakokinetische Untersuchungen	99
5.5. Bestimmung der gerinnungshemmenden Wirksamkeit	101
5.5.1. Gerinnungszeiten	101
5.5.2. Thrombosemodell nach Wessler	102
5.6. Allgemeine Synthesevorschriften	103

5.6.1. Synthese der P1-Bausteine	109
5.6.2. Synthese der P2-P1-Segmente	110
5.6.3. Synthese der P3-P2-P1-Bausteine	115
5.6.4. Synthese der P4-P3-Segmente	117
5.6.5. Synthese der P4-P3-P2-Bausteine	124
5.6.6. Aminosäuresynthese und Racemattrennung	127
5.6.7. Synthese der Inhibitoren	132
<u>6. Literatur</u>	151
<u>Anhang</u>	

1. Einleitung

Das menschliche Blutgerinnungssystem ist ein fein reguliertes Netzwerk biochemischer Prozesse, die eine normale Blutstillung gewährleisten und notwendige Reparaturprozesse nach Verletzungen einleiten. In einem funktionierenden Blutgerinnungssystem besteht eine lebensnotwendige Balance zwischen pro- und antikoagulativen Abläufen. Eine Unterfunktion oder das Ausbleiben der Blutgerinnung kann selbst bei kleinen Verletzungen zu massiven Blutungen führen; andererseits begünstigt eine erhöhte Gerinnungsneigung die Entstehung von Thromben und birgt somit eine hohe Gefahr von Thrombosen und Embolien.

1.1. Das Blutgerinnungssystem

Die Blutstillung wird in zwei miteinander gekoppelte Prozesse unterteilt, die primäre und die sekundäre Hämostase.

Unmittelbar nach einer Verletzung führt die primäre Hämostase zur Bildung eines vorläufigen, reversiblen Thrombozytenpfropfes durch Anlagerung von Thrombozyten an die Wundränder. Der bei einer Gefäßverletzung exponierte von-Willebrand-Faktor dient dabei als Anker für die Plättchen-Adhäsion und die über ihre GP-Ib/IX-Rezeptoren angelagerten Blutplättchen werden aktiviert. Dadurch kommt es zu einem Gestaltwandel (*shape change*)¹ der Thrombozyten und einer damit verbundenen Freisetzung von Serotonin, Adenosindiphosphat (ADP), Plättchenfaktor 4 und anderen Mediatorstoffen. Serotonin führt zur lokalen Vasokonstriktion im verletzten Gewebe und unterstützt somit die Blutstillung, ADP aktiviert weitere Blutplättchen und Plättchenfaktor 4 inaktiviert zusätzlich das gerinnungshemmende Heparin. Der Zeitraum zwischen der Verletzung und der Bildung des Primärverschlusses wird als Blutungszeit bezeichnet und beträgt normalerweise 2-3 Minuten. Allerdings ist der zunächst entstandene Thrombozytenpfropf nicht für einen dauerhaften Verschluss der Wunde geeignet [Triplett, 2000; Geiger, 1999].

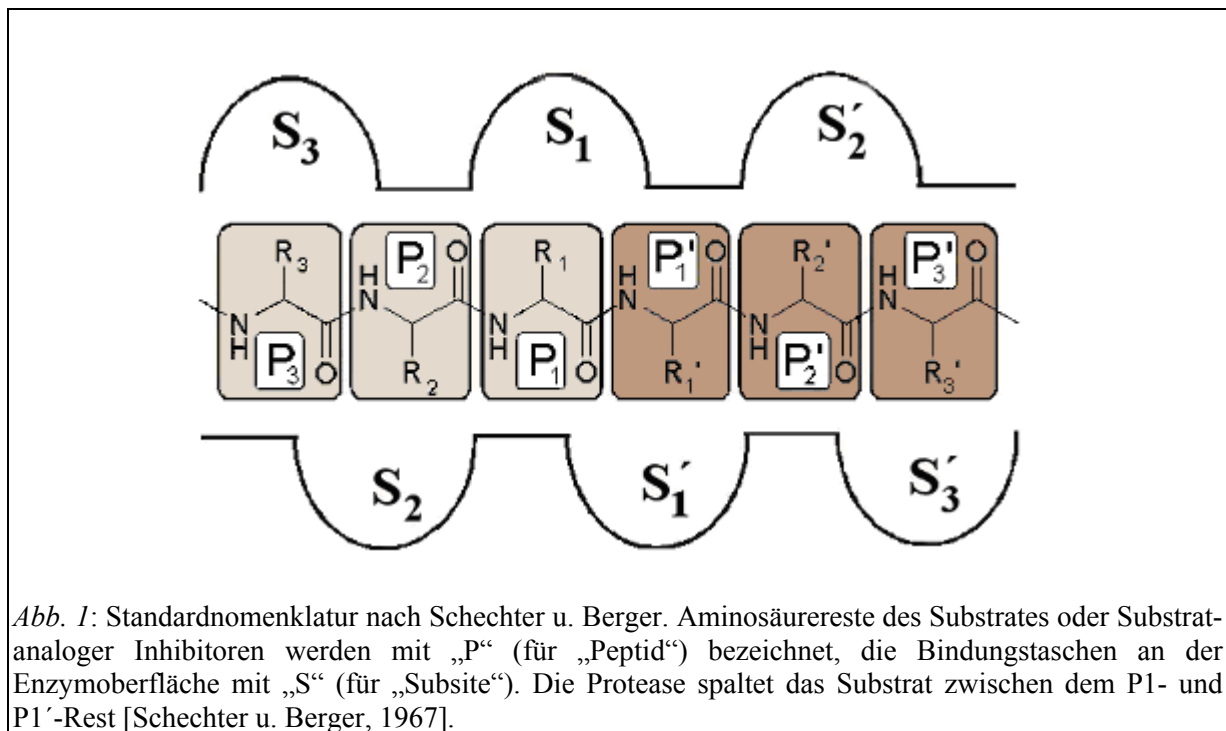
Die sekundäre Hämostase, die eigentliche Blutgerinnung, führt zur Bildung eines stabilen Gerinnungsthrombus und gewährleistet einen sicheren Wundverschluss. Innerhalb der Blutgerinnung unterscheidet man klassischerweise zwei Aktivierungskaskaden: den extravaskulären (extrinsischen) Weg und den intravaskulären (intrinsischen) Weg. Während die Gerinnungsaktivierung über die extrinsische Kaskade innerhalb weniger Sekunden stattfindet, läuft der intrinsische Weg deutlich langsamer ab [Davie *et al.*, 1991].

Bei den meisten an der Blutgerinnung beteiligten Faktoren (II, VII, IX, X, XI, XII, Protein C) handelt es sich um Trypsin-artige Serinproteasen mit den drei Aminosäuren Serin195,

¹ Englische und lateinische Fachbegriffe werden im Folgenden durch kursive Schreibweise gekennzeichnet.

1. Einleitung

Histidin57 und Aspartat102 im aktiven Zentrum. Diese Proteasen besitzen am Boden ihrer S1-Bindetasche (*Abb. 1*) in Position 189 eine Asparaginsäure und spalten daher Peptidbindungen ihrer Substrate C-terminal von den basischen Aminosäuren Arginin oder Lysin. Im Blutkreislauf liegen die Gerinnungsfaktoren zunächst in ihrer inaktiven Proform (als Zymogene) vor und werden durch proteolytische Aktivierung in ihre enzymatisch aktive Form² umgewandelt. Dadurch kommt es zu einem kaskadenartigen Ablauf der Blutgerinnung. Die Faktoren V, VIII und Protein S wirken als Kofaktoren und besitzen selbst keine proteolytische Aktivität. Faktor XIII gehört nicht zu den Serinproteasen, es handelt sich hierbei um eine Transglutaminase (vgl. auch *Abb. 2*) [Voet u. Voet, 1992; von Depka-Prondzinski *et al.*, 2002].



Die meisten enzymatischen Reaktionen der Gerinnungskaskade finden auf einer Phospholipidoberfläche (PL) statt. Solche Oberflächen werden vor allem durch aktivierte Plättchen, aber auch beschädigte Gefäßzellen bereitgestellt. Dies begrenzt die Koagulation auf den Ort der Verletzung und verhindert eine systemische Gerinnungsaktivierung. Die Bindung von Gerinnungsfaktoren auf der Phospholipidoberfläche wird durch ihre Gla-Domänen ermöglicht, welche die ungewöhnliche Aminosäure γ -Carboxyglutaminsäure enthalten. Diese Komplexbildung ist Calcium-abhängig und entscheidend für die Aktivierbarkeit der Gerinnungsfaktoren. Hat die γ -Carboxylierung der Glutaminsäurereste nicht stattgefunden

² Die aktive Form von Gerinnungsfaktoren wird durch ein kleines „a“ (z.B. Faktor Xa) gekennzeichnet.

oder ist Calcium nicht in ausreichenden Mengen vorhanden, ist eine Komplexbildung auf der Phospholipidoberfläche nicht möglich und die Aktivierungskette wird unterbrochen. Die Calcium-Abhängigkeit dieser Reaktionen ermöglicht außerdem die Nutzung von Komplexbildnern, wie z.B. Natriumcitrat oder EDTA, für die *in vitro*-Antikoagulation. *In vivo* ist diese Vorgehensweise nicht möglich, da ein systemischer Calcium-Entzug zu schwerer Tetanie führen würde [Booth u. Saltzman, 2001; Berkner, 2001].

Auslöser für den extrinsischen Gerinnungsweg ist die mit einer Gewebeerletzung verbundene Freisetzung von *Tissue Factor* (TF) aus subendothelialen Zellen. Freigesetzter TF bildet mit zirkulierendem Faktor VII (FVII) den aktiven TF/VIIa-Komplex, der in Gegenwart von Calcium-Ionen Faktor X (FX) aktiviert (Übersicht: *Abb. 2*) [Lu *et al.*, 2004].

Die Aktivierung des intrinsischen Weges erfolgt durch Kontakt von Faktor XII (FXII) mit einer negativ geladenen Oberfläche, z.B. nach einer Verletzung. Sie kann aber auch durch körperfremde Materialien, wie Dialysesysteme, sowie entzündliche und arteriosklerotische Veränderungen der Gefäßendothelien ausgelöst werden. FXII wird dadurch zu FXIIa aktiviert. Erste Spuren von FXIIa katalysieren in Gegenwart von hochmolekularem Kininogen (HMWK) die Umwandlung von Plasmapräkallikrein zu Plasmakallikrein (PK), welches über einen positiven Rückkopplungs-Mechanismus (*feedback*) wiederum FXII aktiviert (Kontakt-Aktivierungssystem). Nach Bildung einer kritischen Menge an FXIIa erfolgt schließlich die kaskadenartige Aktivierung der Faktoren XI und IX. Faktor IXa (FIXa) bewirkt im Komplex mit Faktor VIIIa und Calcium-Ionen die Bildung von Faktor Xa (FXa) [Leblond u. Winocour, 1999; Kolde, 2001].

Extrinsischer und intrinsischer Weg führen beide zur Aktivierung von FX. FXa bildet zusammen mit Calcium-Ionen und Faktor Va an einer Phospholipidoberfläche den sogenannten Prothrombinasekomplex, welcher die Umwandlung von Prothrombin (Faktor II) in aktives Thrombin (Faktor IIa) katalysiert. Die Hauptaufgabe des gebildeten Thrombins ist die Fibrinbildung. Durch Abspaltung der Fibrinopeptide A und B von Fibrinogen entsteht monomeres Fibrin, welches zu langen Strängen aggregiert. Die durch Thrombin aktivierte Transglutaminase Faktor XIIIa bewirkt eine kovalente Längs- und Quervernetzung der instabilen Fibrinfäden, wodurch ein stabiles Gerinnsel entsteht. Im letzten Schritt erfolgt eine durch Thrombosthenin ausgelöste Retraktion der Fibrinfäden. Dabei nähern sich die Wundränder weiter an und das Gerinnsel wird nochmals verfestigt (Übersicht: *Abb. 2*) [Davie *et al.*, 1991; Doolittle 2001]

Eine weitere Funktion des Thrombins ist die Aktivierung der ubiquitär vorkommenden Protease-aktivierbaren Rezeptoren PAR1 und PAR4. Thrombin ist der wirksamste bekannte

1. Einleitung

Plättchenaktivator und spaltet den extrazellulären N-Terminus der PARs auf den Thrombozyten. Die dadurch neu entstehende rezeptorgebundene N-terminale Sequenz des PAR wirkt als eigener Agonist und löst so die Plättchenaggregation aus [Coughlin, 2000].

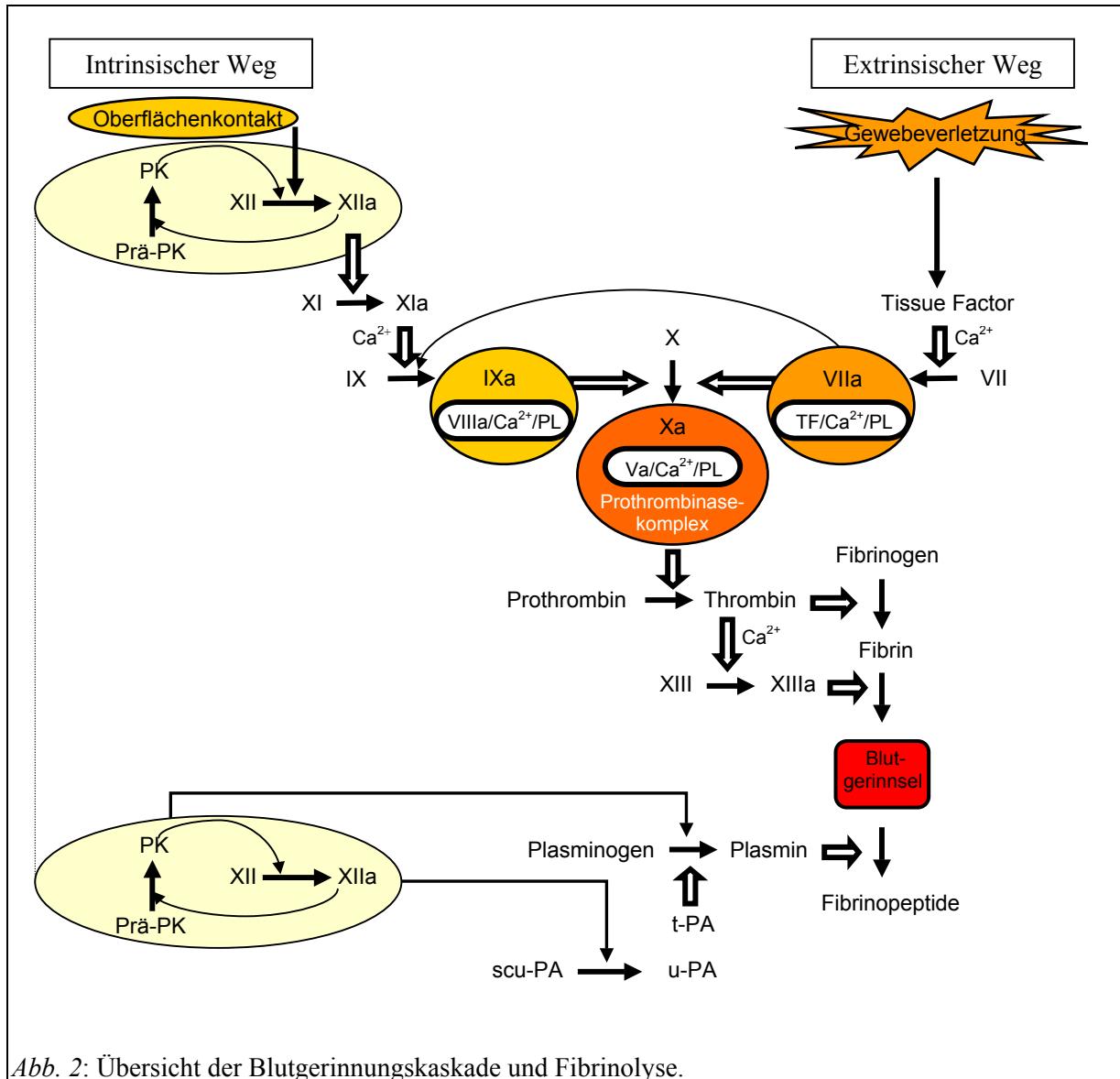


Abb. 2: Übersicht der Blutgerinnungskaskade und Fibrinolyse.

Neben den beiden Hauptwegen der Blutgerinnung bestehen auch Verknüpfungen zwischen dem extrinsischen und intrinsischen Weg. So kann FVIIa neben FX auch FIX aktivieren.

Weiterhin existieren positive Rückkopplungs-Mechanismen, welche die Blutgerinnung zusätzlich verstärken. Die meisten dieser positiven *feedback*-Reaktionen werden durch Thrombin ausgelöst, welches unter anderem die Faktoren V, VIII und XI aktiviert. Daneben ist FXa in der Lage, die Faktoren VII, VIII und IX zu aktivieren.

In Gegenwart von Thrombomodulin existiert ein negativer Thrombin-induzierter *feedback*-Mechanismus über die Bildung von Protein Ca, das den Gerinnungsprozess unterbricht.

Protein Ca spaltet im Komplex mit Protein S als Kofaktor die Faktoren Va und VIIIa und verhindert somit eine weitere Aktivierung von FX und Prothrombin [Davie *et al.*, 1991; Berkner, 2001].

Um eine übermäßige Blutgerinnung zu verhindern, sind zusätzlich endogene Gerinnungshemmstoffe im Blut vorhanden. Der wichtigste dieser Inhibitoren ist Antithrombin, ein in der Leber gebildetes α_2 -Globulin. Antithrombin bildet stabile Komplexe mit den freien Gerinnungsfaktoren Thrombin, Xa, IXa, XIa und XIIa und blockiert dadurch ihre aktiven Zentren. Diese Reaktion kann stark beschleunigt werden, wenn Antithrombin an Glykosaminglykane wie Heparansulfat oder Heparin bindet, wodurch eine Konformationsänderung am Antithrombin induziert wird und die Wechselwirkungen mit dem Enzym verstärkt werden [Kaiser, 2002]. Weitere endogene Inhibitoren der Gerinnungsproteasen sind α_2 -Makroglobulin, das unspezifisch Enzyme blockiert und so ihre biologische Aktivität unterbindet, sowie Heparin-Kofaktor II (HCII) und *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI).

Die Blutgerinnung befindet sich im Gleichgewicht mit der Fibrinolyse. Das fibrinolytische System hat die Aufgabe, intravasal entstehende Gerinnsel und nicht mehr benötigtes Fibrin (z.B. nach erfolgter Wundheilung) aufzulösen, um so Blutgefäße und andere Röhrensysteme, wie beispielsweise die Harnwege, von Fibrinablagerungen freizuhalten. Die Aktivierung der Fibrinolyse erfolgt durch Plasminogenaktivatoren oder das plasmatische Kontakt-Aktivierungssystem (FXIIa, HMWK und PK). Als wichtigster Plasminogenaktivator ist vor allem *Tissue-type Plasminogen Activator* (tPA) für die physiologische Fibrinolyse verantwortlich. tPA wird hauptsächlich in Gefäßendothelien gebildet und bei Bedarf ins Blut abgegeben. Die tPA-Freisetzung kann auch durch PK ausgelöst werden, das ebenfalls eine direkte Aktivierung von Plasminogen bewirkt. Auch Urokinase (*Urokinase-type Plasminogen Activator* oder uPA), die vor allem in der Niere synthetisiert wird und erstmals aus Urin isoliert werden konnte, zählt zu den Plasminogenaktivatoren. Urokinase wird auch von verschiedenen anderen Zellen gebildet und ist in ihrer inaktiven Proform (sc-uPA) auch im Plasma vorhanden, wo FXIIa die Umwandlung von einkettiger sc-uPA in zweikettige Urokinase (tc-uPA bzw. uPA) vermitteln kann [Leblond u. Winocour, 1999; Kolde, 2001; von Depka-Prondzinski *et al.*, 2002]. Die Bedeutung der Urokinase in der Fibrinolyse ist nicht völlig geklärt. Man nimmt an, dass uPA eine größere Rolle beim Gewebeumbau (*tissue remodeling*) und der Zellmigration spielt und deshalb das Tumorstadium und die Metastasierung fördert [Mignatti u. Rifkin, 1993, Andreasen *et al.*, 2000].

Über diese Wege wird Plasminogen zu Plasmin aktiviert, welches schließlich Fibrin in lösliche Produkte abbaut. Plasmin spaltet auch die Faktoren Va und VIIIa und hemmt so

direkt die Blutgerinnung. Außerdem baut es Fibrinogen ab, dessen Spaltprodukte ebenfalls gerinnungshemmend wirken. Auch das fibrinolytische System wird durch endogene Inhibitoren kontrolliert, wie z.B. α_2 -Antiplasmin, welches schnell freies Plasmin bindet und deaktiviert, jedoch nur langsam mit lokal an Fibrin gebundenem Plasmin reagiert. Weitere Fibrinolyse-Inhibitoren sind *Plasminogen Activator Inhibitor Type 1* (PAI-1) und die Carboxypeptidase *Thrombin Activated Fibrinolysis Inhibitor* (TAFI). Auch α_2 -Makroglobulin ist an der Hemmung der Plasminogenaktivatoren und von freiem Plasmin beteiligt [Leblond u. Winocour, 1999; Kolde, 2001; Nesheim, 2003].

Neuere Erkenntnisse geben Hinweise auf komplexere Zusammenhänge und unterscheiden nicht mehr streng zwischen intrinsischer und extrinsischer Gerinnung. Statt dessen werden die einzelnen Prozesse in überlappende Phasen unterteilt, die auf Oberflächen stattfinden und bei denen *Tissue Factor* als der primäre Auslöser der Hämostase gilt [Hoffmann u. Monroe, 2001; Moll u. Roberts, 2002].

1.2. Blutgerinnungsstörungen

Kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Blutgerinnung und Fibrinolyse, werden pathologische Veränderungen ausgelöst, die zu Blutungen aber auch zur Thrombenbildung führen können [Nesheim, 2003].

Ursachen für Hämostasestörungen sind sowohl die zumeist krankheits- oder medikamentenbedingte Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion (Thrombasthenie) oder Thrombozytenmangel (Thrombozytopenie), als auch vaskuläre Veränderungen (z.B. bei Skorbut) oder Mangel an Gerinnungsfaktoren (Koagulopathien). Bei einem Mangel an Gerinnungsfaktoren unterscheidet man zwischen angeborenen und erworbenen Koagulopathien. Angeborene Koagulopathien, wie z.B. von-Willebrand-Erkrankungen sowie Hämophilie A und B, zeigen einen charakteristischen Mangel von nur einem Gerinnungsfaktor. Dagegen liegt den erworbenen Koagulopathien meist ein Vitamin-K-Mangel oder eine Leberschädigung zugrunde, wodurch die Synthese mehrerer Gerinnungsfaktoren gestört ist. Die Therapie der Hämostasestörungen richtet sich nach ihren Ursachen. Vitamin-K-Mangelzustände können durch Gabe von Vitamin-K-Präparaten behandelt werden, bei Mangel an Gerinnungsfaktoren oder Fibrin können Gerinnungsfaktor-Präparate oder eine Fibrinogen-Infusion indiziert sein [Triplett, 2000; Mutschler *et al.*, 2003].

Im Falle einer übermäßigen Blutgerinnung, aber auch bei verminderter Fibrinolyse, kommt es zur Entstehung von intravasalen Blutgerinnseln, den Thromben. Abscheidungsthromben (weiße Thromben) entstehen vor allem in arteriellen Gefäßen durch Thrombozyten-

aggregation und Einlagerung von Fibrin, während sich Gerinnungsthromben (rote Thromben) meist venös oder in stenosierte Arterien aufgrund verminderter Fließgeschwindigkeit bilden. Auch Schädigungen der Gefäßwand, z.B. durch arteriosklerotische Plaques, oder eine beschleunigte Gerinnung (Hyperkoagulopathie) tragen zur Thrombenentstehung bei [Geiger, 1999]. Thromben können im schlimmsten Fall in Endarterien eine ischämische Nekrose verursachen (z.B. Herzinfarkt), aber auch losgelöst werden und als Embolus an einem anderen Ort einen akuten Gefäßverschluss (z.B. Lungenembolie) bewirken. Vor allem nach solch einem Vorfall (Rückfallrisiko), aber auch bei Risikopatienten, wie z.B. Rauchern, oder während bzw. nach operativen Eingriffen, längerer Bettruhe sowie langen Flugreisen ist das Thromboserisiko erhöht [Weitz u. Hirsh, 2001].

1.3. Konventionelle antithrombotische Therapie

Thromboembolische Erkrankungen gehören zu den häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität in den westlichen Industrieländern. Da im klinischen Alltag thrombotische Erkrankungen wesentlich häufiger auftreten als Hämostasestörungen, ist eine Akuttherapie der Patienten ebenso notwendig wie eine wirksame Thromboseprophylaxe.

1.3.1. Thrombozytenaggregationshemmer

Da sich an entzündlich oder arteriosklerotisch veränderten Gefäßendothelien sowie an körperfremden Oberflächen aufgrund von Plättchenaggregation arterielle Abscheidungsthromben bilden können, werden Thrombozytenfunktionshemmer vor allem zur Prophylaxe arterieller Thrombosen angewendet [Geiger, 1999].

Die am häufigsten angewendete Substanz ist die Acetylsalicylsäure (ASS - Aspirin®). ASS bewirkt schon in geringen Dosierungen durch Acetylierung eine irreversible Hemmung der Cyclooxygenase-1 (COX-1), welche auch für die Synthese von Vorstufen des zur Plättchenaggregation notwendigen Thromboxans A₂ verantwortlich ist. Da Thrombozyten keinen Zellkern besitzen und somit auch kein neues Enzym bilden können, wird ihre Aggregation irreversibel gehemmt. Erst neu gebildete Thrombozyten können wieder aggregieren. Andere Hemmstoffe der Thrombozytenfunktion sind ADP-Rezeptor-Antagonisten, wie Clopidogrel (Iscover®) und Ticlopidin (Tiklyd®), welche die ADP-induzierte Thrombozytenaktivierung und dadurch deren Vernetzung der Thrombozyten über den Glycoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorkomplex verhindern. Auch direkte GP-IIb/IIIa-Antagonisten, wie z.B. Abciximab (ReoPro®), Eptifibatid (Integrilin®) oder Tirofiban (Aggrastat®), werden zur Hemmung der Thrombozytenaggregation eingesetzt. Diese blockieren den GP-IIb/IIIa-Rezeptor an der Plättchenoberfläche und dadurch ebenfalls die

Thrombusbildung. Außerdem wird ASS in Kombination mit dem Vasodilatator Dipyridamol (Asasantin[®]) eingesetzt [Patrono *et al.*, 2001].

Bei diesen Medikamenten können Blutungen als Nebenwirkungen auftreten, es kann aber auch vor allem bei ASS zu gastrointestinalen Störungen kommen [Hirsh *et al.*, 2001a].

1.3.2. Antikoagulantien

Antikoagulantien treten entweder direkt mit den Enzymen der Blutgerinnung in Kontakt und hemmen deren Funktion (direkte Antikoagulantien) oder wirken mit Hilfe von Kofaktoren bzw. durch Hemmung der Gerinnungsfaktorsynthese (indirekte Antikoagulantien). Man unterscheidet zwischen *in vitro* (z.B. für die Herstellung von Blutkonserven) und *in vivo* (zur Therapie) eingesetzten Substanzen. Vor allem beim Auftreten von akuten Ereignissen, wie Herzinfarkt oder Angina Pectoris, aber auch zur Thrombose- und Embolieprophylaxe vor, während und nach operativen Eingriffen ist eine Behandlung mit Antikoagulantien indiziert.

Indirekte Antikoagulantien - Heparin und Analoga

Heparin, ein körpereigenes polyanionisches Polysaccharid, wird in Mastzellen und basophilen Granulozyten gebildet. Parenteral zugeführt hemmt es sofort die Blutgerinnung durch Bindung und Aktivierung von Antithrombin, welches schließlich vor allem Thrombin und FXa hemmt. Der für die Thrombinhemmung notwendige Komplex kann nur durch Heparine mit einer Kettenlänge von mehr als 18 Monomeren gebildet werden, kürzerkettige Heparine fördern dagegen vor allem die FXa-Hemmung.

Zur Therapie stehen verschiedene Heparine zur Verfügung: Unfraktioniertes Heparin (UFH) wird auch als Standardheparin bezeichnet und aus Schweinedarmmukosa und Rinderlunge gewonnen. Sein Molekulargewicht reicht von 3000 bis 30000 Da. Die Dosierung von UFH erfolgt aufgrund der nicht einheitlichen Zusammensetzung verschiedener Zubereitungen in Internationalen Einheiten (I.E.) und erfordert häufige Therapiekontrollen (*Monitoring*). Daher wird UFH vor allem in der Klinik zur kurzfristigen Prophylaxe und in akuten Fällen eingesetzt. Niedermolekulares Heparin (*Low Molecular Weight Heparin*, LMWH) mit einem mittleren Molekulargewicht von 4000 bis 6000 Da wird durch enzymatischen oder chemischen Abbau aus UFH hergestellt und hemmt hauptsächlich FXa. Durch die homogenere Zusammensetzung und die geringere Plasmaproteinbindung ist der gerinnungshemmende Effekt von LMWH besser vorhersagbar, wodurch in vielen Fällen auf ein regelmäßiges *Monitoring* verzichtet werden kann und auch eine längerfristige Anwendung außerhalb der Klinik möglich wird [Hirsh *et al.*, 2001b].

Neben den verschiedenen Heparinen werden auch die sogenannten Heparinoide, die ebenfalls eine Heparin-artige, Antithrombin-abhängige Wirkung besitzen, therapeutisch eingesetzt. Heparinoide sind aus Schweinedarmmukosa gewonnene Gemische niedermolekularer Glykosaminglykane und hemmen - je nach Zusammensetzung - FXa sowie Thrombin. Ein Vertreter ist Danaparoid-Natrium (Orgaran[®]), das zur Vorbeugung von tiefen Venenthrombosen und zur Behandlung thromboembolischer Erkrankungen zugelassen wurde [Hirsh *et al.*, 1998].

Aufgrund der Beobachtung, dass die Bindung von fünf spezifischen Zuckermolekülen an Antithrombin für die Wirkung des Heparins verantwortlich ist, wurden Wirkstoffe entwickelt, die nur aus diesem Heparinsegment aufgebaut sind. Diese synthetischen Pentasaccharide hemmen ausschließlich FXa. Sie besitzen den Vorteil chemischer Homogenität und einer geringeren molaren Masse verglichen mit Heparinen und Heparinoiden, sind allerdings ebenfalls nur parenteral anwendbar. In Deutschland ist das in Zusammenarbeit mit der Firma Organon entwickelte Pentasaccharid Fondaparinux-Natrium (Arixtra[®]) der Firma Sanofi-Aventis zur Thromboseprophylaxe nach größeren orthopädischen Eingriffen zugelassen; mit Idraparinux befindet sich derzeit ein weiteres Pentasaccharid dieser Firmen in der klinischen Phase III [Bauer, 2003].

Der wesentliche Nachteil der Heparine und der davon abgeleiteten Substanzen liegt in der Applikationsform, denn durch die parenterale Gabe (*i.v.* oder *s.c.*) ist eine Anwendung außerhalb der Klinik nur eingeschränkt möglich. Auch der indirekte Antithrombin-abhängige Wirkmechanismus limitiert den Einsatz von Heparinen. Ist aus irgendeinem Grund (z.B. bei Lebererkrankungen) nicht genug Antithrombin im Blut vorhanden, bleibt eine Heparin-Gabe wirkungslos. Ein weiterer Nachteil ist, dass Heparin lediglich frei im Blut zirkulierendes Thrombin hemmt, aber unwirksam bei Fibrin-gebundenem Thrombin ist [Hirsh *et al.*, 2001b]. Außerdem kann Heparin schwere Nebenwirkungen hervorrufen. Neben Blutungen und verschiedenen allergischen Reaktionen kann es zu einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT) kommen, bei der man zwei Formen unterscheidet: Die frühzeitig auftretende HIT vom Typ I verläuft nicht-immunogen und zumeist komplikationslos, während HIT II nach einer Latenzzeit von durchschnittlich 10 Tagen zu thromboembolischen Komplikationen führt. Diese werden dadurch ausgelöst, dass Heparin einen Komplex mit Plättchenfaktor 4 bildet, welcher als Antigen erkannt wird und somit eine IgG-vermittelte Plättchenaktivierung bewirkt. In diesen Fällen ist eine Weiterbehandlung mit Heparin nicht möglich und eine alternative Behandlung mit Heparinoiden oder Hirudin (siehe unten) indiziert [Tardy-Poncet *et al.*, 1999; Warkentin *et al.*, 2003].

Indirekte Antikoagulantien - Vitamin-K-Antagonisten

Die Synthese der meisten Gerinnungsfaktoren findet Vitamin-K-abhängig in der Leber statt. Dort erfolgt eine γ -Carboxylierung bestimmter Glutaminsäurereste in den Gerinnungsfaktor-Vorstufen unter Bildung von γ -Carboxyl-Glutaminsäure (Gla). Erst dadurch wird die Aktivierbarkeit des Proenzym möglich. Die Derivate des 4-Hydroxycumarins, auch Cumarine, sind die wesentliche Wirkstoffgruppe der Vitamin-K-Antagonisten. Wichtige Vertreter sind u.a. Warfarin (Coumadin[®]) und Phenprocoumon (Marcumar[®]). Die Cumarine wirken durch Hemmung der Vitamin-K-Reduktase, was eine Blockade der Regenerierung von Vitamin-K-Hydrochinon aus Vitamin-K-Epoxid zur Folge hat. Bedingt durch diesen Mechanismus tritt die Wirkung der Vitamin-K-Antagonisten erst nach Verringerung der Konzentration noch im Blut vorhandener Gerinnungsfaktoren ein, wodurch eine Latenzzeit von 1-3 Tagen zustande kommt. Eine Akuttherapie ist mit diesen Antikoagulantien daher nicht möglich, sie werden vor allem zur Langzeittherapie eingesetzt [Hirsh *et al.*, 2001a]. Zu beachten ist, dass auch die Synthese der gerinnungsregulierend wirkenden Faktoren Protein C und Protein S von der Therapie mit Vitamin-K-Antagonisten betroffen ist. Da ihre Halbwertszeit deutlich geringer ist als die der Gerinnungsfaktoren, kann zu Beginn der Cumarin-Gabe ein durch Mangel an Protein C bedingtes erhöhtes Thromboserisiko bis hin zur Cumarinnekrose auftreten. Aus diesem Grund ist eine initiale zusätzliche Behandlung mit Heparin o.ä. unerlässlich.

Der große Vorteil der Vitamin-K-Antagonisten besteht in der Möglichkeit der oralen Applikation, was die Anwendung außerhalb der Klinik deutlich erleichtert. Allerdings besitzen Cumarine den Nachteil, dass, neben dem verzögerten Wirkbeginn, ihre Wirkung wegen der langen Halbwertszeit auch nach dem Absetzen noch lange erhalten bleibt.

Häufige Nebenwirkungen sind Blutungskomplikationen und allergische Hautveränderungen. Da Absorption, Metabolisierung und Eliminierung stark von Patient zu Patient schwanken können, ist ein enges *Monitoring* erforderlich. Wegen der geringen therapeutischen Breite der Cumarin-Derivate können Wechselwirkungen mit zahlreichen Medikamenten und Nahrungsmitteln zu schweren Blutungen, aber auch zu anderen Komplikationen oder einem Wirkungsverlust führen [Ansell *et al.*, 2001].

Direkte Antikoagulantien - Hirudin und Analoga

Die stark gerinnungshemmende Substanz Hirudin wurde erstmals aus dem Drüsensekret des Blutegels *Hirudo medicinalis* gewonnen [Markwardt, 1957, 1970]. Inzwischen wird das 65 Aminosäuren lange Polypeptid rekombinant hergestellt. Hirudin ist ein direkter Thrombininhibitor, welcher eine praktisch irreversible Hemmung des Thrombins bewirkt.

Diese Wirkung ist Antithrombin-unabhängig, was ein Vorteil gegenüber Heparin ist. Parenteral applizierte rekombinante Hirudin-Derivate, z.B. Lepirudin (Refludan[®]) und Desirudin (Revasc[®]), werden vor allem postoperativ und in akuten Fällen therapeutisch eingesetzt, in denen Heparine kontraindiziert sind (z.B. bei HIT). Hauptnebenwirkungen sind auftretende Blutungen; zu allergischen Reaktionen kommt es selten. Wie auch beim Heparin, liegt der entscheidende Nachteil in der parenteralen Applikationsform [Hirsh *et al.*, 2005].

1.3.3. Fibrinolytika (Thrombolytika)

Während die Hauptaufgabe der Thrombozytenaggregationshemmer und Antikoagulantien darin besteht, die Bildung und Entstehung von Thrombosen und die damit verbundenen klinischen Folgen zu verhindern, ist eine andere Gruppe von Substanzen notwendig, um schon bestehende Gerinnsel wieder zu beseitigen. Diese Fibrinolytika wirken indirekt über Plasminogenaktivierung und führen zur Fibrinolyse, d.h. der Auflösung von Gerinnseln. Verwendet werden uPA (rheothromb[®]), rekombinanter tPA (Alteplase - Actilyse[®] und Reteplase - Rapilysin[®]) sowie Streptokinase (Streptase[®], aus *Streptococcus*-Arten). Ihr Einsatz ist wegen der hohen Blutungsgefahr streng an die Klinik gebunden und hauptsächlich bei akutem Myokardinfarkt, arteriellen und venösen Thrombosen der Extremitäten sowie Embolien indiziert. Eine gleichzeitige Gabe eines Fibrinolytikums mit ASS verhindert erneute Koronarverschlüsse bei Herzinfarkt-Patienten. Fibrinolytika können bei Überdosierung ebenfalls schwere Blutungen auslösen. In diesen Fällen kann ihre Wirkung durch Aprotinin (Trasylo[®]), ein Antifibrinolytikum, welches die Plasminbildung und -wirkung hemmt, antagonisiert werden [Leblond u. Winocour, 1999].

1.4. Das ideale Antithrombotikum

Die aufgezählten Therapieformen und Wirkstoffe werden derzeit erfolgreich zur antithrombotischen Therapie eingesetzt. Leider ist ihr Einsatz auch mit Nachteilen und z.T. schweren Nebenwirkungen verbunden. Daher wird nach neuen antithrombotischen Substanzen gesucht, die den Anforderungen eines idealen Antithrombotikums gerecht werden. Ein solches ideales Antithrombotikum sollte selektiv einen bestimmten Gerinnungsfaktor hemmen und die normale Hämostase nicht stören. Ebenfalls sollte es nach oraler Gabe resorbiert und anschließend langsam aus dem Kreislauf eliminiert werden, eine hohe therapeutische Breite besitzen und keine wesentlichen Nebenwirkungen haben [Sixtma u. deGroot, 1992; Hauptmann u. Stürzebecher, 1999].

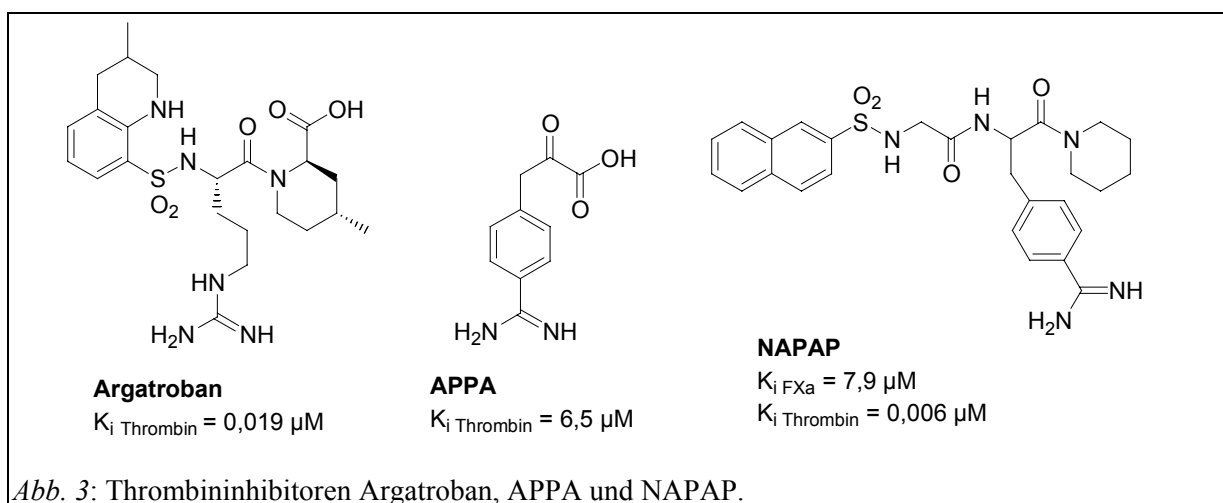
1.5. Alternative Antikoagulantien - Hemmstoffe der Gerinnungsproteasen

Um gezielt in die Blutgerinnung einzugreifen und eine antithrombotische Wirkung zu erzielen, bieten sich mehrere Zielenzyme innerhalb der Gerinnungskaskade an.

Lange Zeit stand vor allem Thrombin im Mittelpunkt des Hemmstoffdesigns, inzwischen sind aber auch zahlreiche wirksame Inhibitoren der Faktoren Xa und VIIa entwickelt worden [Hirsh *et al.*, 2005].

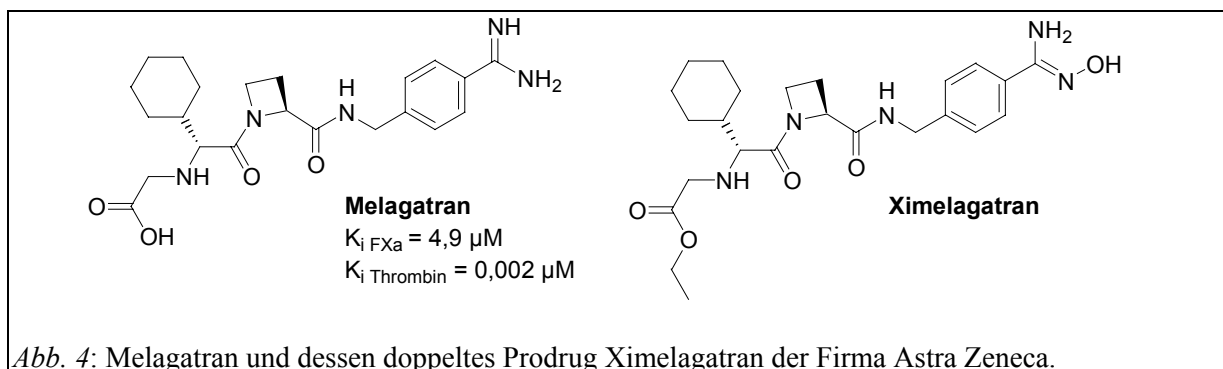
1.5.1. Thrombinhemmung

Thrombin, als das finale Schlüsselenzym der Gerinnungskaskade, wurde schon frühzeitig als Angriffspunkt für eine gezielte Hemmung identifiziert. Ausgehend von dem natürlich vorkommenden Hirudin wurde der reversibel wirksame Thrombininhibitor Hirulog (Bivalirudin) entwickelt [Maraganore *et al.*, 1990]. Nachteil dieses synthetischen, aus 20 Aminosäuren bestehenden Hirudin-Analogons ist seine parenterale Applikation (*i.v.*). Deshalb wird seit vielen Jahren an der Entwicklung niedermolekularer Wirkstoffe gearbeitet, da diese potentiell oral applizierbar sind. Allerdings waren auch die ersten Thrombinhemmstoffe mit einem reduzierten Molekulargewicht, die bereits Anfang der 80er Jahre entwickelt wurden, nicht oral applizierbar. Dazu gehört Argatroban [Okamoto *et al.*, 1981], das in Japan und den USA als intravenöses Antikoagulans zugelassen ist. Andere niedermolekulare Thrombininhibitoren vom D-Phe-Pro-Arg-Typ leiten sich vom Fibrinopeptid A, dem Spaltprodukt des Fibrinogens, ab. Zusätzlich wurden zahlreiche Benzamidin-Derivate entwickelt, wie z.B. 4-Amidinophenylbrenztraubensäure (APPA) [Markwardt *et al.*, 1974] oder NAPAP [Stürzebecher *et al.*, 1983, 1993] (*Abb. 3*), die aber für den therapeutischen Einsatz ungeeignet waren [Hauptmann u. Stürzebecher, 1999].



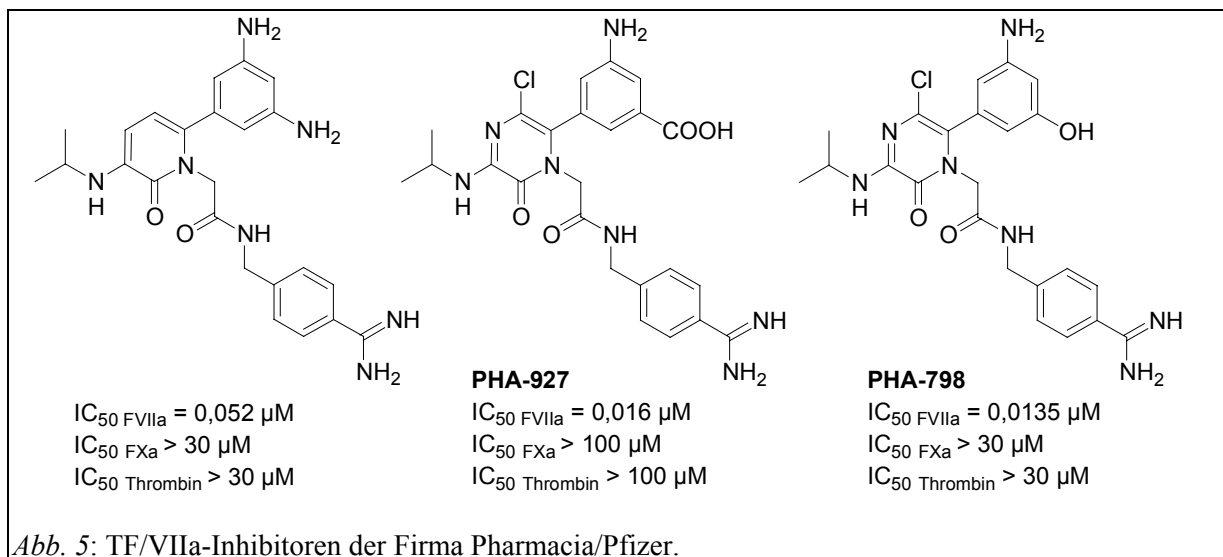
1. Einleitung

Aufbauend auf den Ergebnissen von Röntgenstrukturanalysen des Thrombins und den damit erworbenen Informationen über die Struktur seines aktiven Zentrums [Bode *et al.*, 1989; Stubbs u. Bode, 1993], wurde in den 90er Jahren eine gezielte strukturbasierte Synthese wirksamerer Verbindungen möglich. Erst kürzlich wurde mit Ximelagatran (Exanta[®]), einem doppelten Prodrug der Wirksubstanz Melagatran, der erste orale Thrombinhemmstoff zur Prophylaxe venöser thromboembolischer Ereignisse bei Patienten nach einer Hüftersatz- oder Kniegelenkersatz-Operation zugelassen (Abb. 4). Ximelagatran besitzt eine orale Bioverfügbarkeit von etwa 20 % und wird nach der Resorption rasch in seine Wirkform Melagatran umgewandelt. Melagatran ist ein kompetitiv-reversibler und selektiver Thrombininhibitor ($K_i = 2,0 \text{ nM}$), der sowohl frei zirkulierendes, als auch Fibrin-gebundenes Thrombin hemmt [Gustafsson *et al.*, 1998, 2001, 2004]. Da bei über 6 % der Patienten nach längerer Anwendung von Melagatran bzw. Ximelagatran erhöhte Lebertransaminase-Werte beobachtet wurden [Fiessinger *et al.*, 2005] und noch unzureichende Langzeitdaten vorliegen, beträgt die empfohlene Behandlungsdauer maximal 11 Tage. Zudem kann es auch bei der Behandlung mit Melagatran, wie bei allen anderen Antikoagulantien, zu Blutungskomplikationen kommen [Francis, 2004; Halperin, 2005].



1.5.2. TF/VIIa-Hemmung

Gerinnungsfaktor VIIa bzw. dessen aktiver Komplex zusammen mit *Tissue Factor* ist das initiale Enzym der extrinsischen Gerinnung. Daher ist die gezielte Hemmung des TF/VIIa-Komplexes eine potentielle Möglichkeit zur Verhinderung thromboembolischer Ereignisse in Folge einer durch Gefäßwandverletzung ausgelösten TF-Freisetzung. Basierend auf der Röntgenstruktur des TF/VIIa-Komplexes [Banner *et al.*, 1996] haben verschiedene Gruppen niedermolekulare Inhibitoren entwickelt. Wie bei FXa, wird auch hier davon ausgegangen, dass eine Hemmung des TF/VIIa-Komplexes eine wirksame antithrombotische Therapie ermöglicht, ohne dabei die normale Hämostase signifikant zu beeinträchtigen. Man geht davon aus, dass TF/VIIa-Inhibitoren möglicherweise ein vermindertes Blutungsrisiko besitzen [Robinson u. Saiah, 2002]. Vor allem durch die Firma Pharmacia/Pfizer wurden zahlreiche Verbindungen mit einem Pyrazinon- oder Pyridon-Kern und einem 4-Amidinobenzylamidrest in P1-Position entwickelt (*Abb. 5*) [Parlow *et al.*, 2003a, 2003b, 2003c]. Inzwischen wurden Studien mit den spezifischen TF/VIIa-Hemmstoffen PHA-927 und PHA-798 durchgeführt und es wurde gezeigt, dass diese Verbindungen antithrombotisch wirksam sind und die Blutungszeit kaum verlängern [Salyers *et al.*, 2004; Suleymanov *et al.*, 2003; Szalony *et al.*, 2003]. Jedoch wurde bislang noch kein TF/VIIa-Inhibitor in die klinische Entwicklung überführt.



1.5.3. Faktor Xa-Hemmung

Wie Thrombin spielt auch FXa eine zentrale Rolle in der Blutgerinnung. Eine Inhibierung von FXa besitzt möglicherweise wesentliche Vorteile gegenüber der Thrombinhemmung: FXa ist das aktive Enzym im Prothrombinasekomplex, der die Bildung von Thrombin katalysiert. Eine Hemmung von FXa kann daher die fortwährende Neubildung von Thrombin verhindern, was durch einen Thrombinhemmstoff nicht möglich ist. Bereits gebildetes Thrombin wird in diesem Fall jedoch nicht inaktiviert [Al-Obeidi u. Ostrem, 1998]. Allerdings verhindert ein FXa-Inhibitor in therapeutischer Dosierung die Thrombinbildung nicht vollständig, geringe Mengen ($\leq 1,0$ nM; vgl. Kapitel 2.3.2., Abb. 57 bis Abb. 59) stehen weiterhin für die primäre Hämostase zur Verfügung [Al-Obeidi u. Ostrem, 1999; Zhu u. Scarborough, 1999]. Anders als bei der Thrombinhemmung, hat eine Inhibierung von FXa keinen Einfluss auf die Plättchenfunktion, die essentiell für eine normal funktionierende Hämostase ist [Ewing *et al.*, 1999]. Es ist demzufolge anzunehmen, dass bei einer FXa-Hemmung weniger Blutungskomplikationen auftreten als bei der Anwendung von konventionellen Antithrombotika und direkten Thrombininhibitoren [Al-Obeidi u. Ostrem, 1999; Zhu u. Scarborough, 1999].

Der Plasmaspiegel von Prothrombin ist mit ca. $1,4 \mu\text{M}$ etwa 10-fach höher als der von FX ($\approx 0,14 \mu\text{M}$). Zudem ist der Aktivierungsschritt von Prothrombin zu Thrombin stark amplifiziert - ein Molekül FXa im Prothrombinasekomplex ist in der Lage, pro Minute ca. 140 Moleküle Thrombin zu generieren. Aus diesen Gründen wird davon ausgegangen, dass bereits durch geringere Konzentrationen an FXa-Hemmstoffen mit einer Thrombinhemmung vergleichbare antithrombotische Effekte erzielt werden können [Zhu u. Scarborough, 1999].

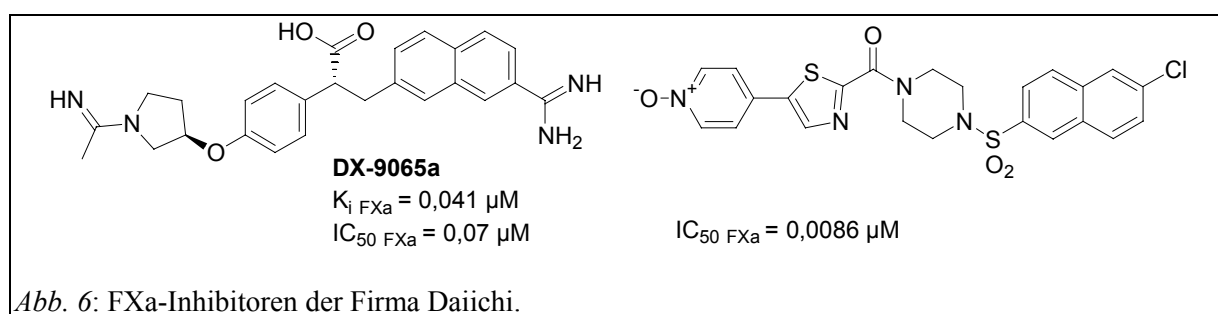
Es sind mehrere natürlich vorkommende Polypeptid-artige Inhibitoren des FXa bekannt, wie z.B. Antistasin aus dem Mexikanischen Blutegel *Haementeria officinalis*, Tick Anticoagulant Protein (TAP) aus der Zecke *Ornithodoros moubata* sowie Yagin aus dem Blutegel *Hirudo medicinalis* [Al-Obeidi u. Ostrem, 1999]. Vor allem Antistasin und rekombinantes TAP (r-TAP) wurden intensiv in verschiedenen Thrombosemodellen untersucht. Dort wurde ihre Wirksamkeit bestätigt und festgestellt, dass diese Substanzen verglichen mit Heparin oder Hirudin z.T. effektiver sind und bei gleicher antithrombotischer Wirksamkeit weniger Blutungen verursachen [Zhu u. Scarborough, 1999]. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine FXa-Hemmung als therapeutischer Ansatz zur Prophylaxe und Therapie thromboembolischer Erkrankungen geeignet ist.

In den 90er Jahren gelang erstmalig die Röntgenstrukturanalyse des FXa im Komplex mit synthetischen Inhibitoren und es wurden Erkenntnisse über deren Bindungsmodus und Wechselwirkungen im katalytischen Zentrum gewonnen [Padmanabhan *et al.*, 1993;

Brandstetter *et al.*, 1996]. Deshalb haben Mitte der 90er Jahre viele Gruppen begonnen, niedermolekulare synthetische Hemmstoffe von FXa zu entwickeln. Inzwischen befinden sich mehrere Inhibitoren in der klinischen Prüfung, jedoch ist bisher noch kein synthetischer FXa-Hemmstoff als Arzneimittel zugelassen [Quan u. Smallheer, 2004].

Ursprünglich wurde angenommen, dass für eine starke Wirksamkeit eine basische Gruppe in P1-Position, vorzugsweise ein Benzamidinrest oder ein anderes Arginin-Mimetikum, notwendig ist. Inzwischen existieren auch mehrere wirksame Verbindungen mit neutralen P1-Resten. Daher kann man die bekannten Inhibitoren in Verbindungen mit basischem oder mit neutralem P1-Segment einteilen.

Einer der ersten wirksamen FXa-Hemmstoffe mit basischem P1-Rest war DX-9065a der Firma Daiichi (*Abb. 6*) [Katakura *et al.*, 1993]. DX-9065a ist ein kompetitiver, selektiver und potenter FXa-Hemmstoff ($K_i = 41 \text{ nM}$) und zeigt eine ausreichend lange Verweildauer in der Zirkulation von Versuchstieren. Die Wirksamkeit von DX-9065a, sowie eine vergleichbar geringe Blutungsneigung wurden in verschiedenen klinischen Studien der Phase II nachgewiesen. Aufgrund der stark geladenen Gruppen ist die orale Bioverfügbarkeit jedoch sehr gering [Hara *et al.*, 1995; Alexander *et al.*, 2005]. Die Weiterentwicklung der Leitstruktur DX-9065a führte erst kürzlich zu 6-Chloronaphthalen-Verbindungen mit neutralem P1-Rest, die eine verbesserte FXa-Hemmung und antithrombotische Wirksamkeit, sowie eine orale Bioverfügbarkeit von ca. 30 % in Ratten besitzen. Die wirksamste Verbindung besitzt in P3/P4-Position³ eine Thiazol-5-yl-pyridin-N-Oxid-Gruppe und hemmt FXa mit einem IC_{50} -Wert von 8,6 nM (*Abb. 6*) [Haginoya *et al.*, 2004a, 2004b].

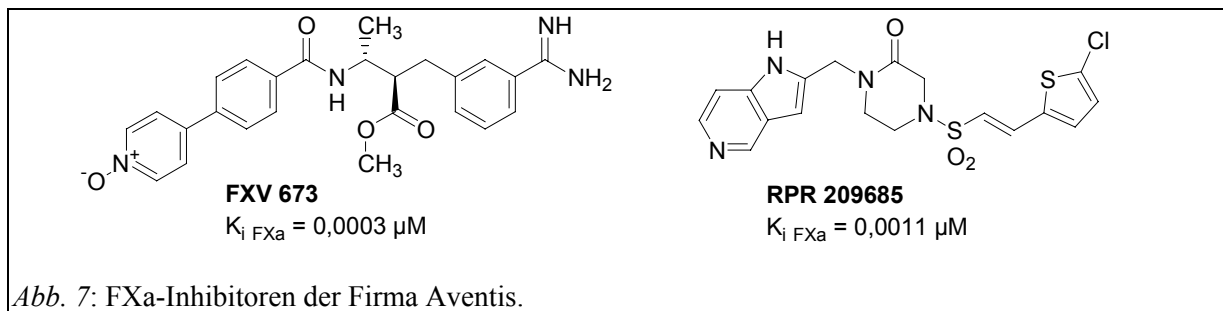


Die Verbindung FXV 673 der Firma Aventis besitzt eine 3-Amidinobenzylfunktion als P1-Rest und einen Phenylpyridin-N-Oxid-Rest, der in die Aryl-Bindungstasche gerichtet ist (*Abb. 7*). FXV 673 ist ein kompetitiv-reversibler FXa-Inhibitor ($K_i = 0,4 \text{ nM}$), der eine exzellente Selektivität (≥ 1000 -fach) gegenüber anderen Trypsin-artigen Serinproteasen besitzt. *In vitro* zeigt FXV 673 eine starke antikoagulative Wirksamkeit, und in verschiedenen

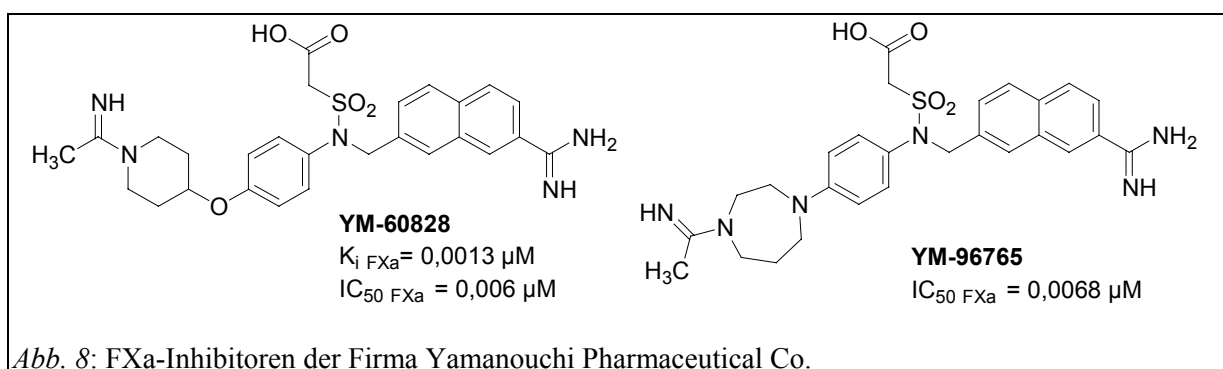
³ Der P3/P4-Rest bindet in die Aryl-Bindungsregion (S3/S4) des FXa (vgl. Kapitel 3.4.1.).

1. Einleitung

Thrombosemodellen konnte ein dosisabhängiger Effekt nachgewiesen werden. FXV 673 wurde für die klinische Prüfung ausgewählt, obwohl keine orale Bioverfügbarkeit beobachtet wurde [Guertin *et al.*, 2002]. Andere Verbindungen vom Ketopiperazin-Typ, wie z.B. RPR 209685 ($K_i = 1,1 \text{ nM}$) mit neutralem 5-Chloro-thiophen-P1-Rest (Abb. 7), haben eine verbesserte Pharmakokinetik und orale Bioverfügbarkeit [Choi-Sledeski *et al.*, 2003]. Es ist jedoch nicht bekannt, ob RPR 209685 in die klinische Entwicklung überführt wurde.



Die Inhibitoren der Firma Yamanouchi Pharmaceutical Co. sind strukturell von DX-9065a abgeleitet und binden mit der Amidinonaphthylgruppe in die S1-Tasche (Abb. 8). Die Verbindungen YM-60828 ($K_i = 1,3 \text{ nM}$) und YM-96765 ($\text{IC}_{50} = 6,8 \text{ nM}$) zeigen *in vitro* und *in vivo* eine starke gerinnungshemmende und antithrombotische Aktivität. YM-96765 hat eine orale Bioverfügbarkeit von 58 % in Hunden und 14,7 % in Affen (*cynomolgus monkeys*) [Hirayama *et al.*, 2002a, 2002b, 2003; Koshio *et al.*, 2004a, 2004b].

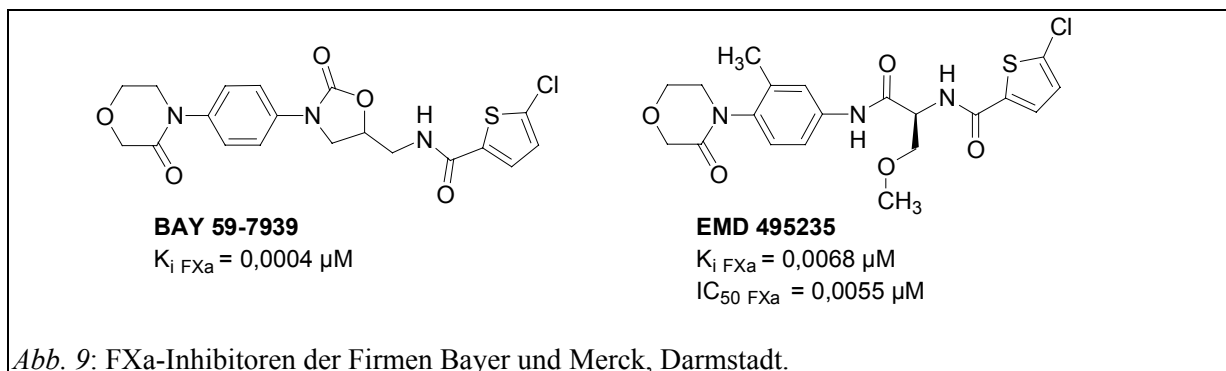


Die Verbindung BAY 59-7939 der Firma Bayer (Abb. 9) befindet sich derzeit in Phase II der klinischen Entwicklung. Sie besitzt eine Hemmkonstante von 0,4 nM und ist mehr als 10000-fach selektiv gegenüber anderen Trypsin-artigen Serinproteasen. Die orale Bioverfügbarkeit dieses Hemmstoffes liegt bei 60 % in Ratten und 80 % in Hunden [Perzborn *et al.*, 2005].

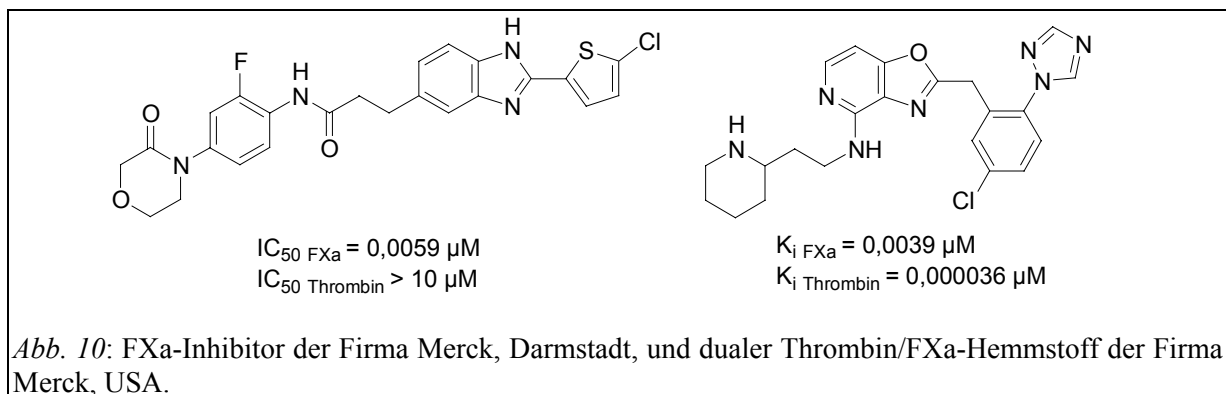
Wie BAY 59-7939, besitzt auch der Inhibitor EMD 495235 der Firma Merck, Darmstadt, einen 5-Chlorthiophen-Carbonylrest als P1-Element und eine Morpholinongruppe in P3/P4-Position (Abb. 9). EMD 495235 ist ein wirksamer Gerinnungshemmstoff im

1. Einleitung

aPTT- und PT-Assay und hat eine orale Bioverfügbarkeit von 60-80 % sowie Halbwertszeiten von ca. 1-3 h in Ratten, Hunden und Affen [Mederski *et al.*, 2004b].



Andere FXa-Hemmstoffe der Firma Merck, Darmstadt, mit einem 5-Chlorthiophenrest in P1-Position und einer Morpholinongruppe als P3/P4-Rest besitzen einen bicyclischen aromatischen Zentralbaustein (Abb. 10) [Mederski *et al.*, 2004a, 2004b]. Darüber hinaus wurden von der Firma Merck, USA, duale Thrombin/FXa-Inhibitoren ($K_i \text{Thrombin} = 0,036 \text{ nM}$; $K_i \text{FXa} = 3,9 \text{ nM}$) mit einem bicyclischen Kern entwickelt (Abb. 10) [Deng *et al.*, 2003].

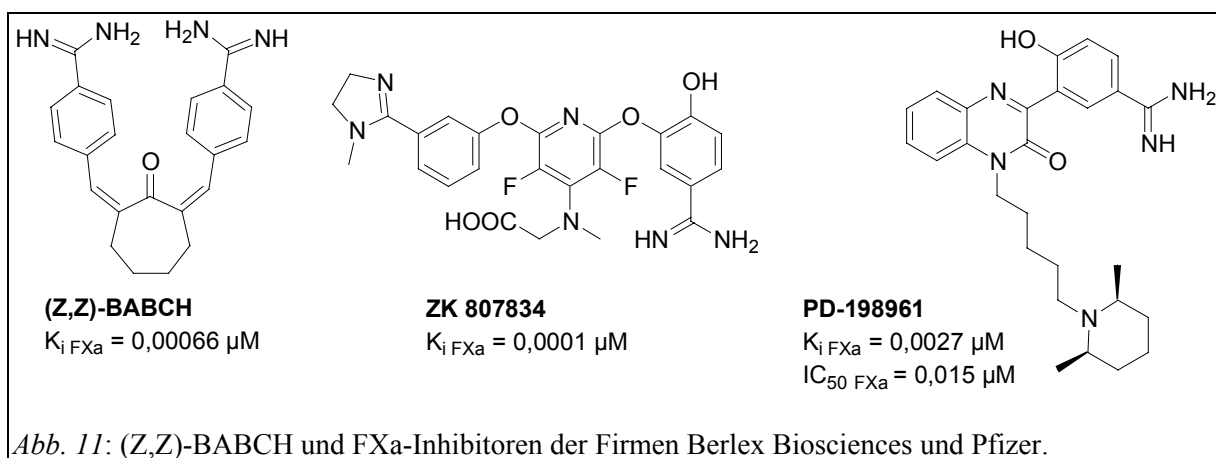


Eine Weiterentwicklung von (Z,Z)-BABCH (Abb. 11) [Stürzebecher *et al.*, 1989; Shaw *et al.*, 1998] durch Berlex Biosciences führte zu ZK 807834 ($K_i = 0,1 \text{ nM}$) mit einer Amidinofunktion im P1-Rest und einem 1-Methyl-2(1H)-Imidazolin als P3/P4-Element (Abb. 11). ZK 807834 wurde aufgrund seiner *in vitro*- und *in vivo*-Aktivität, seiner pharmakokinetischen Eigenschaften sowie Wirksamkeit in experimentellen Thrombosemodellen zur klinischen Entwicklung ausgewählt [Light u. Guilford, 2001]. In einer weiteren Serie wurden von Berlex Biosciences außerdem Verbindungen mit neutralen P1- und P3/P4-Gruppen veröffentlicht [Adler *et al.*, 2002; Chou *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2003].

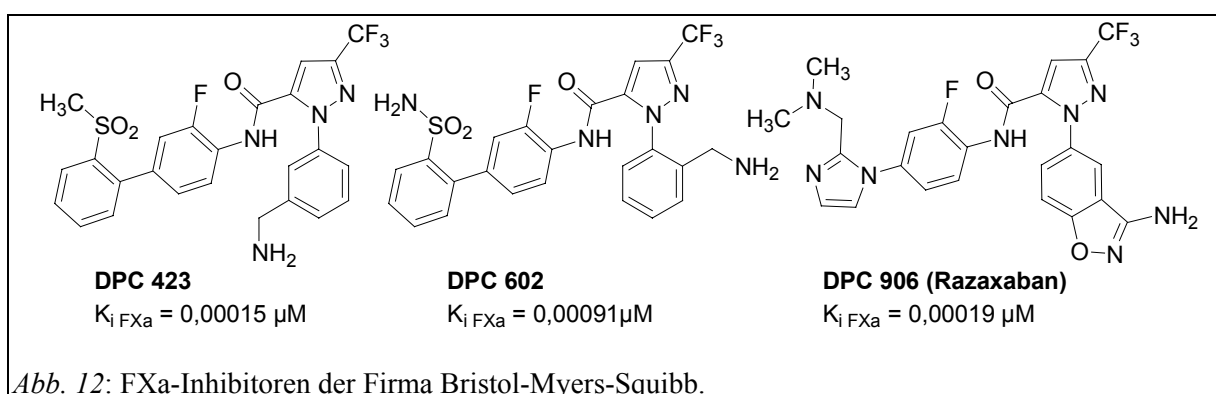
Von der Firma Pfizer wurde eine Gruppe von Benzoxazinon-basierten Inhibitoren entwickelt. Das optimierte Chinoxalinon-Derivat PD-198961 ($K_i = 2,7 \text{ nM}$, Abb. 11) wurde in

1. Einleitung

verschiedenen Thrombosemodellen untersucht und zeigt eine dosisabhängige Wirksamkeit ohne signifikante Beeinflussung der Blutungszeit [Willardsen *et al.*, 2004; Chi *et al.*, 2004].

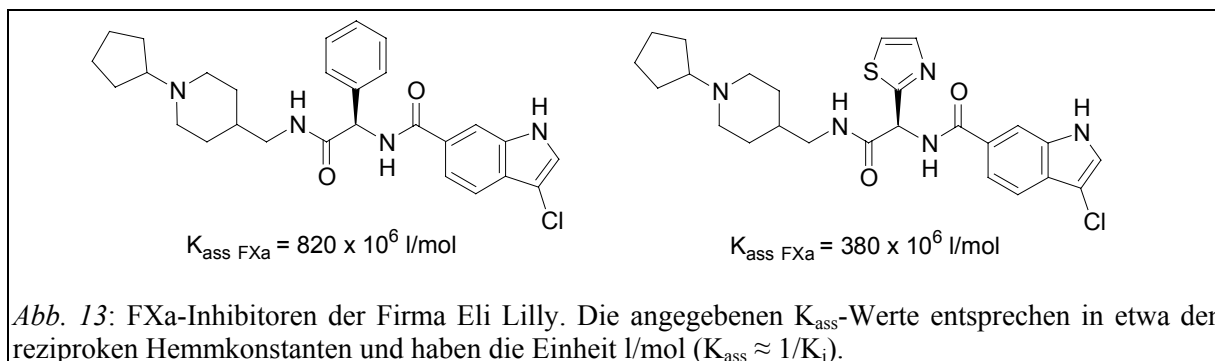


Weitere klinische Kandidaten wurden von Bristol-Myers-Squibb (BMS) hergestellt (Abb. 12). Das Pyrazol-Derivat DPC 423 ($K_i = 0,15 \text{ nM}$) besitzt statt der stark basischen Benzamidfunktion ein Benzylamin als P1-Rest. DPC 423 zeigt eine relativ langsame Eliminierung und eine orale Bioverfügbarkeit von 36 % in Ratten bzw. 57 % in Hunden [Pinto *et al.*, 2001; Quan u. Wexler, 2001]. Nach Optimierung entstand die Verbindung DPC 602 mit einer Halbwertszeit von über 7 h und oraler Bioverfügbarkeit von nahezu 100 % in Hunden [Pruitt *et al.*, 2003]. Durch Austausch der P1-Gruppe mit einem Aminobenzisoxazolrest wurde DPC 906 (Razaxaban) erhalten, ein hoch wirksamer, selektiver und oral verfügbarer FXa-Inhibitor, der sich in der klinischen Prüfung Phase II befindet. Razaxaban besitzt in Hunden eine orale Bioverfügbarkeit von 84 % und zeigt eine dosisabhängige Wirksamkeit in einem Kaninchen-Thrombosemodell. Überraschend ist allerdings die geringe Aktivität in den Gerinnungstests ($\text{IC}_{200 \text{aPTT}} = 6,1 \mu\text{M}$; $\text{IC}_{200 \text{PT}} = 2,1 \mu\text{M}$) [Quan *et al.*, 2003, 2005]. Erst kürzlich wurden von BMS duale Inhibitoren beschrieben, die neben FXa auch FIXa hemmen [Batt *et al.*, 2004; Smallheer *et al.*, 2004; Quiao *et al.*, 2005].

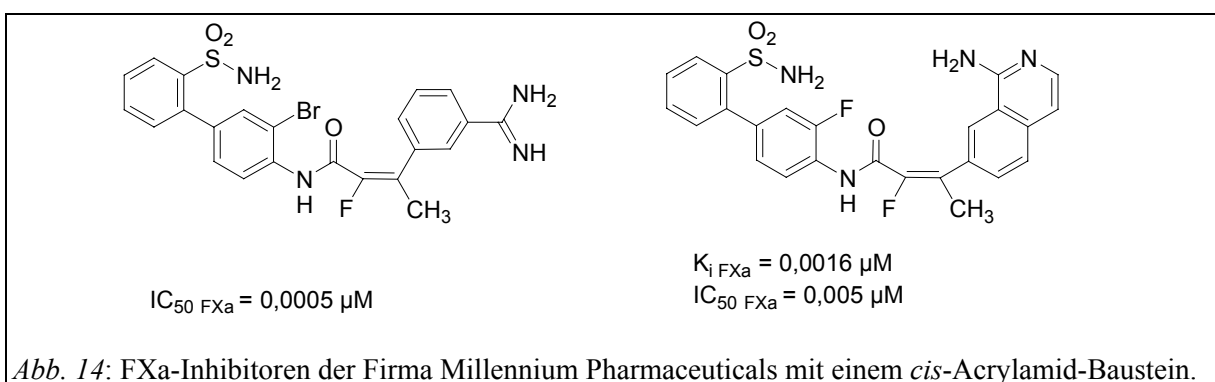


1. Einleitung

Durch die Firma Eli Lilly wurde eine Gruppe von FXa-Inhibitoren mit einer zentralen D-Aminosäure und neutralen P1- und P3/P4-Resten entwickelt (K_i -Werte < 10 nM, *Abb. 13*) [Sheehan *et al.*, 2003], die von Strukturen der Firma Protherics abgeleitet sind [Jones *et al.*, 2001].



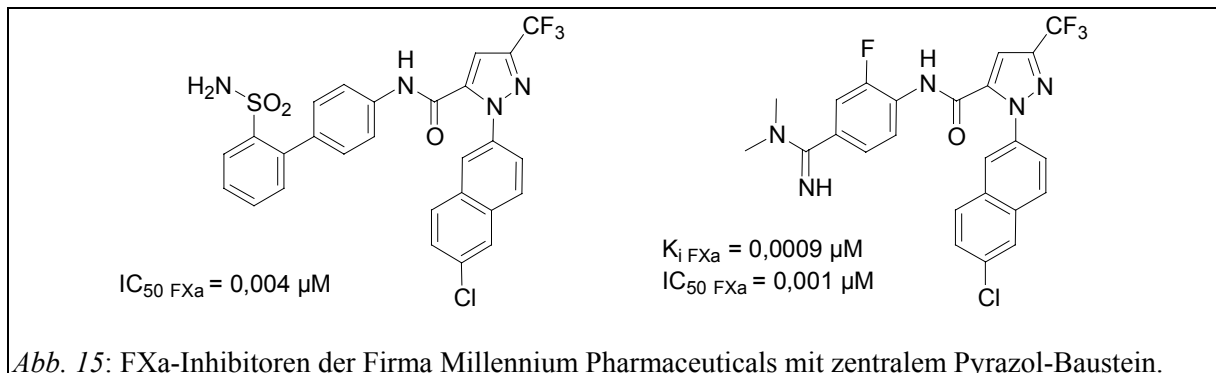
Zu Beginn ihrer Arbeit haben Millennium Pharmaceuticals (früher COR Pharmaceuticals) Übergangszustands-analoga (*transition state*-analoge) Inhibitoren mit C-terminalen Arginal- oder Arginin-Ketonen entwickelt, die kovalent an den Serinrest im aktiven Zentrum des FXa binden. Dabei wurden auch andere, unnatürliche Arginin-Mimetika als P1-Reste eingebaut [Zhu u. Scarborough, 1999; Zhu *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2003]. Als Weiterentwicklung wurden mehrere Serien von nicht-kovalent bindenden FXa-Inhibitoren unterschiedlicher Grundstrukturen synthetisiert. Viele Substanzen besitzen als P3/P4-Rest einen substituierten Biphenyl-Baustein. Eine Gruppe von Inhibitoren enthält ein substituiertes *cis*-Acrylamid als Zentralbaustein und eine Amidinophenyl- [Song *et al.*, 2002a, 2003] bzw. 1-Aminoisochinolinfunktion als P1-Element [Song *et al.*, 2002b] (*Abb. 14*). Die korrespondierenden *trans*-Acrylamide sind ca. 100-fach weniger wirksam.



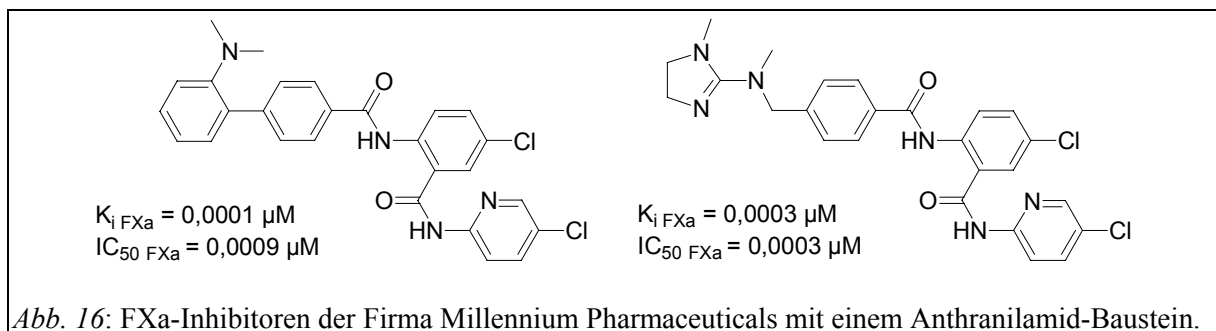
Andere Verbindungen der Firma Millennium Pharmaceuticals besitzen einen zentralen Pyrazol-Baustein und einen halogenierten Naphthylrest als P1-Segment (*Abb. 15*) [Jia *et al.*, 2002, 2004a]. Der Austausch des P3/P4-Biphenyls durch N,N-dialkylierte Benzamidine

1. Einleitung

fürte zu hochwirksamen Verbindungen mit oralen Bioverfügbarkeiten von ca. 14-47 % und Halbwertszeiten von 3-18 h in Ratten. Diese Inhibitoren zeigen eine starke gerinnungshemmende und antithrombotische Wirksamkeit [Jia *et al.*, 2004b].



Zusätzlich wurden durch Millennium Pharmaceuticals Inhibitoren mit einem zentralen Anthranilamid und neutralem P1-Rest beschrieben. Der ursprünglich verwendete Biphenyl-Ligand [Zhang *et al.*, 2004a] wurde durch hydrophilere P3/P4-Gruppen ersetzt. Die wirksamsten Inhibitoren dieser Serie sind sehr selektiv und zeigen in Ratten orale Bioverfügbarkeiten $\geq 44 \%$ sowie Halbwertszeiten von bis zu 8,5 h (Abb. 16) [Zhang *et al.*, 2004b]. Allerdings ist bisher nicht bekannt, ob Inhibitoren der Firma Millennium Pharmaceuticals die klinische Entwicklung erreicht haben.



1.6. Grundstruktur der Inhibitoren

Die in dieser Arbeit synthetisierten FXa-Hemmstoffe sind von einer bekannten Substrat-analogen Grundstruktur abgeleitet (Abb. 17).

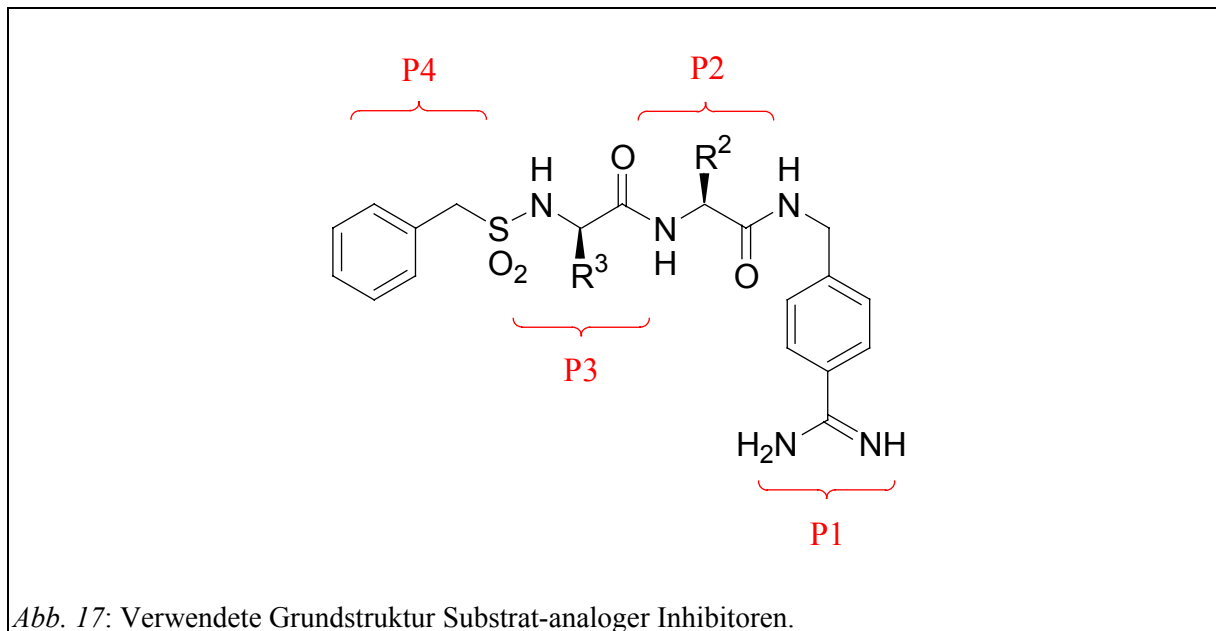


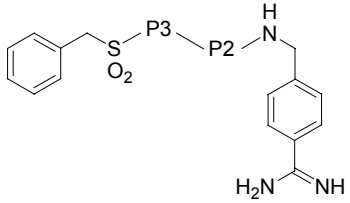
Abb. 17: Verwendete Grundstruktur Substrat-analoger Inhibitoren.

Die Inhibitoren bestehen aus vier Segmenten. Der 4-Amidinobenzylamidrest in P1-Position ist als ein Arginin-Mimetikum wichtig für die Affinität der Hemmstoffe. Durch Optimierung der anderen drei Bausteine (P4-P3-P2) kann die Wirksamkeit, aber vor allem auch die Selektivität der Inhibitoren beeinflusst werden. Dabei wird als P2-Rest Glycin oder eine andere Aminosäure in L-Konfiguration, in P3-Position eine Aminosäure in D-Konfiguration und als P4-Baustein ein hydrophober Sulfonylrest verwendet.

1.6.1. Bekannte Ausgangsverbindungen

Vor Beginn der eigenen Arbeiten waren bereits mehrere, von der Leitstruktur **504** [Stürzebecher *et al.*, 2001] abgeleitete Hemmstoffe synthetisiert worden. Da die Variation der P2-Aminosäure vor allem zu einem Selektivitätsverlust gegenüber Plasmin und Thrombin führte (**510** und **512**), wurde hauptsächlich der D-Ser(tBu)-Rest in P3-Position modifiziert. Dabei hatte sich gezeigt, dass man vor allem durch Einbau basischer Aminosäuren, wie D-Arg (**641**) und D-3-Amidinophenylalanin (D-3-Adf; **649**), sehr wirksame und selektive FXa-Inhibitoren erhalten kann, die relativ langsam eliminiert werden (Tab. 1, Abb. 18).

Tab. 1 - Hemmkonstanten bekannter Substrat-analoger Inhibitoren mit verschiedenen P2- und P3-Aminosäuren (für FXa und andere Trypsin-artige Serinproteasen).

Nr.			K _i (μM)				
	P3	P2	FXa	Thrombin	Plasmin	uPA	Trypsin
504	D-Ser(tBu)	Gly	0,014	0,22	7,7	1,2	0,066
510	D-Ser(tBu)	Pro	0,0088	0,002	0,069	0,18	0,0018
512	D-Ser(tBu)	Ala	0,016	0,0021	0,28	0,3	0,0023
641	D-Arg	Gly	0,005	1,4	2,2	0,33	0,01
649	D-3-Adf	Gly	0,004	0,085	1,0	0,42	0,016

Als Vergleichssubstanz für pharmakokinetische Eliminierungsstudien wurde aufgrund ihrer ausreichend langen Verweildauer in der Zirkulation von Ratten die Verbindung DX-9065a der Firma Daiichi ausgewählt (Abb. 6) [Hara *et al.*, 1995]. Die Untersuchungen zur Eliminierung wurden für alle Inhibitoren, einschließlich DX-9065a, unter identischen Bedingungen durchgeführt; in den meisten Grafiken sind die Mittelwertskurven gezeigt (vgl. Kapitel 5.4.).

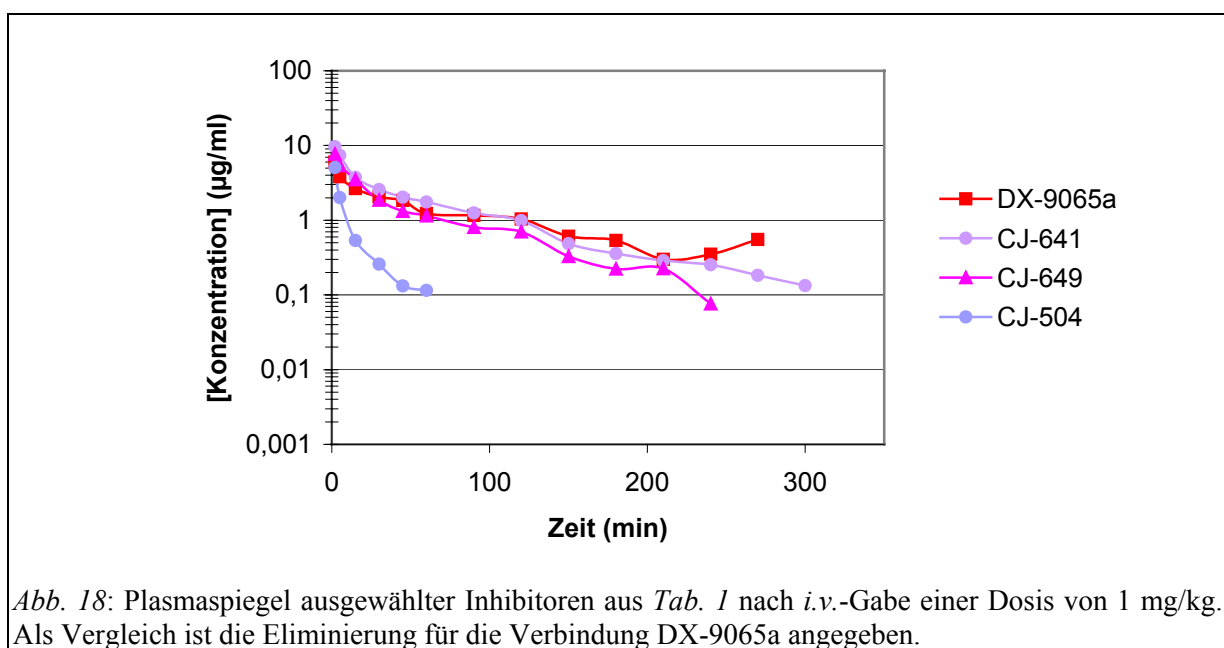


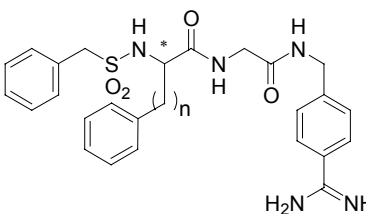
Abb. 18: Plasmaspiegel ausgewählter Inhibitoren aus Tab. 1 nach *i.v.*-Gabe einer Dosis von 1 mg/kg. Als Vergleich ist die Eliminierung für die Verbindung DX-9065a angegeben.

1. Einleitung

Allerdings wurden bei den pharmakokinetischen Bestimmungen mit den Hemmstoffen **641** und **649** toxische Nebenwirkungen (schwerer Blutdruckabfall) beobachtet, die möglicherweise durch den bis-basischen Charakter dieser Verbindungen ausgelöst werden.⁴ Da bis-basische Substanzen außerdem eine geringe Chance auf orale Resorption besitzen, wurde die Entwicklung dieser Verbindungen nicht weiter verfolgt.

Als Alternative zu den basischen P3-Aminosäuren wurden aromatische Aminosäuren mit unterschiedlicher Länge der Seitenketten eingebaut (*Tab. 2*).

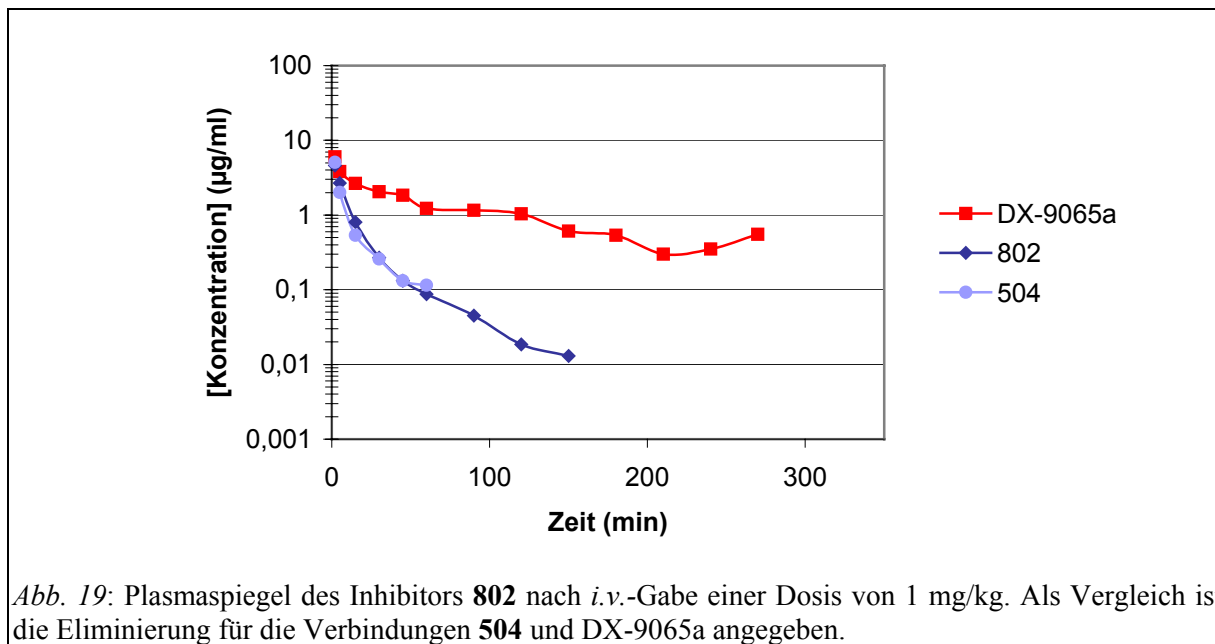
Tab. 2 - Hemmkonstanten der Inhibitoren mit aromatischen P3-Aminosäuren unterschiedlicher Seitenkettenlänge.

Nr.							
	*	n	K _i (μM)				
			FXa	Thrombin	Plasmin	uPA	Trypsin
687	D	0	0,052	0,11	1,8	0,43	0,023
635	D	1	0,078	0,068	1,2	0,9	0,038
802	D	2	0,006	0,047	1,1	0,91	0,011
903	L	2	0,45	8,5	45	25	0,66
818	D	3	0,087	0,21	1,1	1,6	0,048

(* Konfiguration der P3-Aminosäure)

Die wirksamste Hemmung von FXa wurde für das D-Homophenylalanin-Derivat **802** bestimmt ($K_i = 6,0$ nM; *Tab. 2*). Diese Substanz zeigt eine ähnliche FXa-Hemmwirkung wie die Inhibitoren mit D-Arg und D-3-Adf in P3-Position. Der Vergleich der Inhibitoren **802** und **903** macht deutlich, dass der Einbau einer D-Aminosäure in P3-Position zu deutlich stärkeren FXa-Hemmstoffen führt. Obwohl auch Verbindung **802** sehr schnell aus der Zirkulation von Ratten eliminiert wird (*Abb. 19*), wurde sie aufgrund ihrer starken FXa-Hemmung als neue Leitstruktur ausgewählt.

⁴ Dieser Effekt wurde bereits früher für andere Benzamidin-Derivate beschrieben [Kaiser *et al.*, 1987, Pallottini *et al.*, 2002].



1.7. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Entwicklung und Synthese neuer niedermolekularer Inhibitoren des Gerinnungsfaktors Xa vom 4-Amidinobenzylamid-Typ. Im Rahmen eines Projektes zur Entwicklung eines oral verfügbaren FXa-Hemmstoffes sollten ausgehend von den bekannten Leitstrukturen **504** und **802** [Stürzebecher *et al.*, 2001, 2005] optimierte Derivate hergestellt werden. Die Verbindungen sollten eine verbesserte gerinnungshemmende und antithrombotische Wirksamkeit sowie ausreichende Selektivität gegenüber den relevanten Trypsin-artigen Serinproteasen besitzen. Außerdem sollten gezielte Veränderungen dieser Substanzen zu einer Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften führen. Im letzten Schritt sollten Prodrug-Strategien untersucht werden, um eine orale Resorption der Inhibitoren zu ermöglichen.

2. Ergebnisse

2.1. Synthesen

In diesem Kapitel soll an ausgewählten Beispielen die Synthese der Inhibitoren beschrieben werden (zur Nummerierung der Verbindungen und für detaillierte Angaben vgl. Kapitel 5.6.). Abb. 20 zeigt exemplarisch die Synthese der Verbindung **747** (Bzls-D-hPhe-Ser-4-Amidinobenzylamid). Die meisten Inhibitoren wurden nach diesem Syntheschema hergestellt. Dabei wurde das P2-P1- (Schritte 1 und 2; Abb. 21 und Abb. 22) und das P4-P3-Element (Schritt 3; Abb. 23) aufgebaut und beide am Ende der Synthese miteinander gekoppelt (Schritt 4; Abb. 24). In der Regel erfolgte eine Endreinigung der Hemmstoffe mittels präparativer RP-HPLC (vgl. Kapitel 5.6.7.).

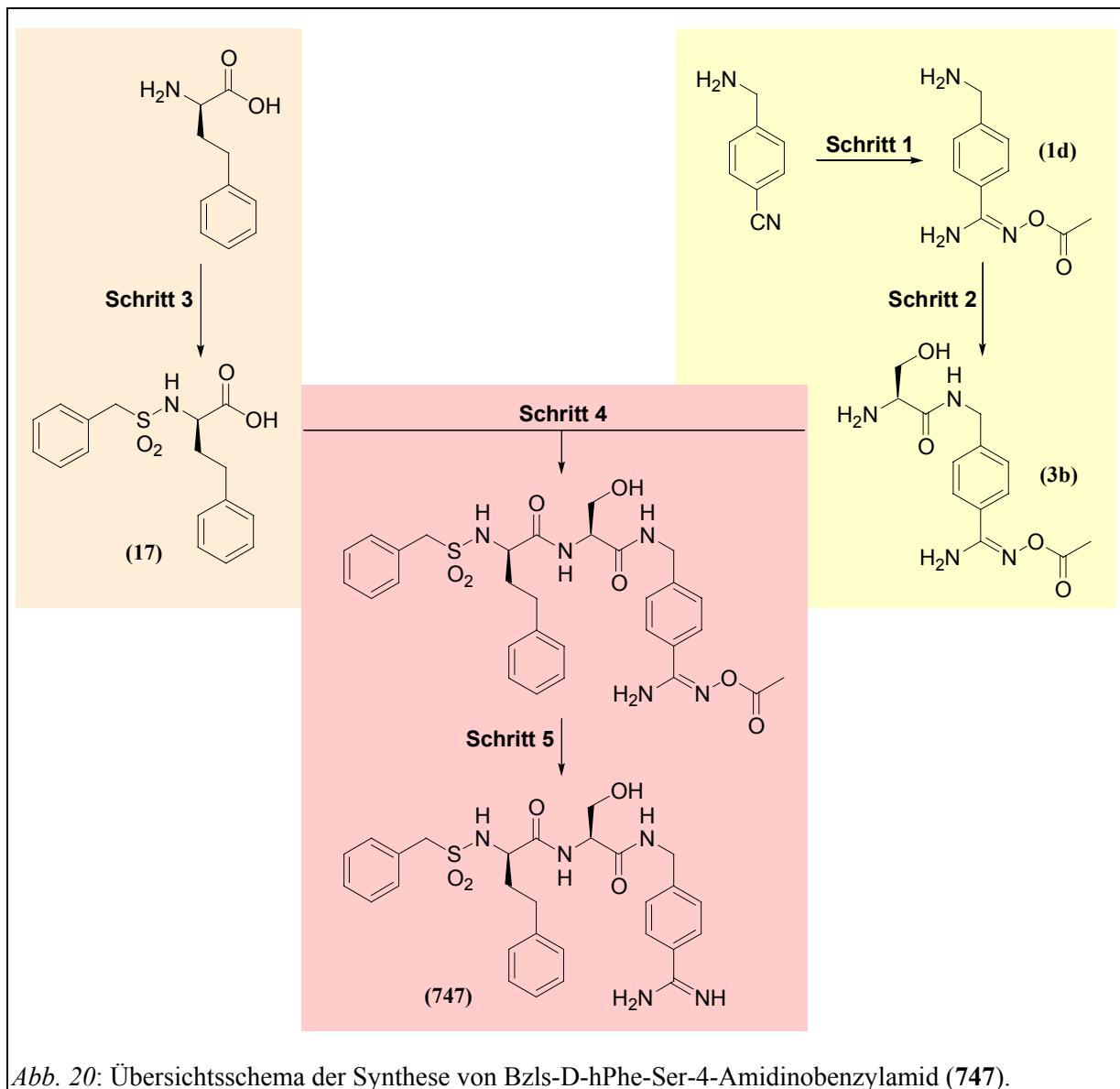
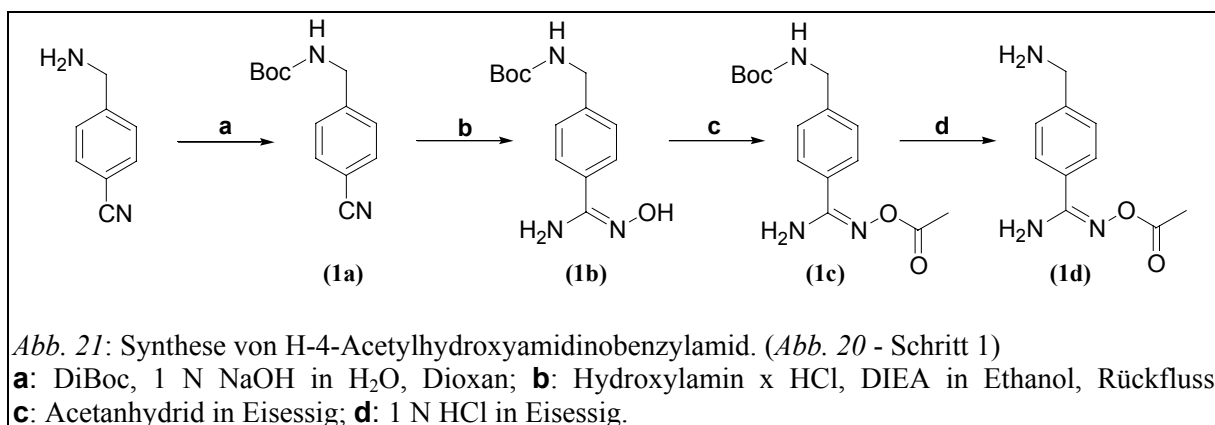


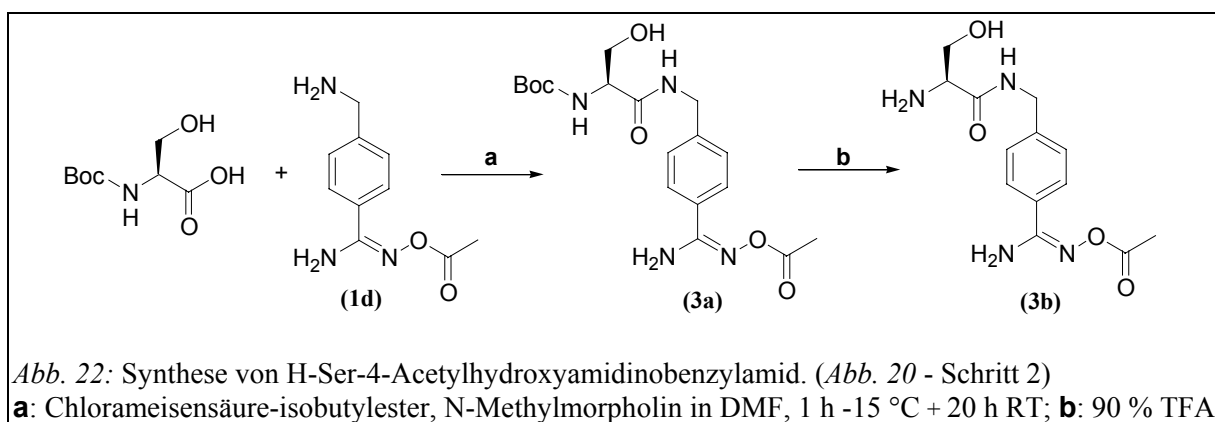
Abb. 20: Übersichtsschema der Synthese von Bzls-D-hPhe-Ser-4-Amidinobenzylamid (**747**).

2. Ergebnisse

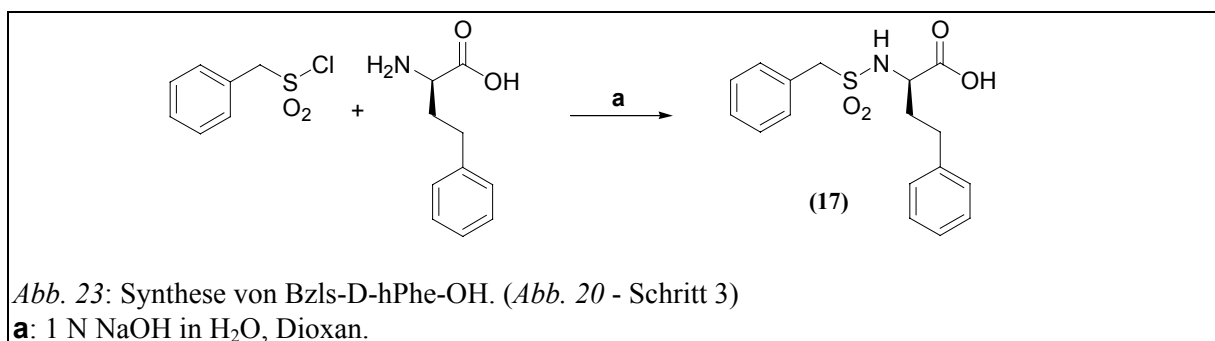
Zur Synthese des P2-P1-Segmentes wurde an den Ausgangsstoff 4-Cyanobenzylamin eine Boc-Schutzgruppe eingeführt (**1a**, Abb. 21) [Moroder *et al.*, 1976]. Das resultierende Boc-4-Cyanobenzylamin wurde in das Hydroxyamidin überführt (**1b**, Abb. 21) [Stüber *et al.*, 1995] und mit Acetanhydrid acetyliert (**1c**, Abb. 21) [Judkins *et al.*, 1996].



Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe (**1d**, Abb. 21) wurde H-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid mittels Mischanhydridverfahren an Boc-Ser-OH gekoppelt (**3a**, Abb. 22) und anschließend die N-terminale Schutzgruppe entfernt (**3b**, Abb. 22).

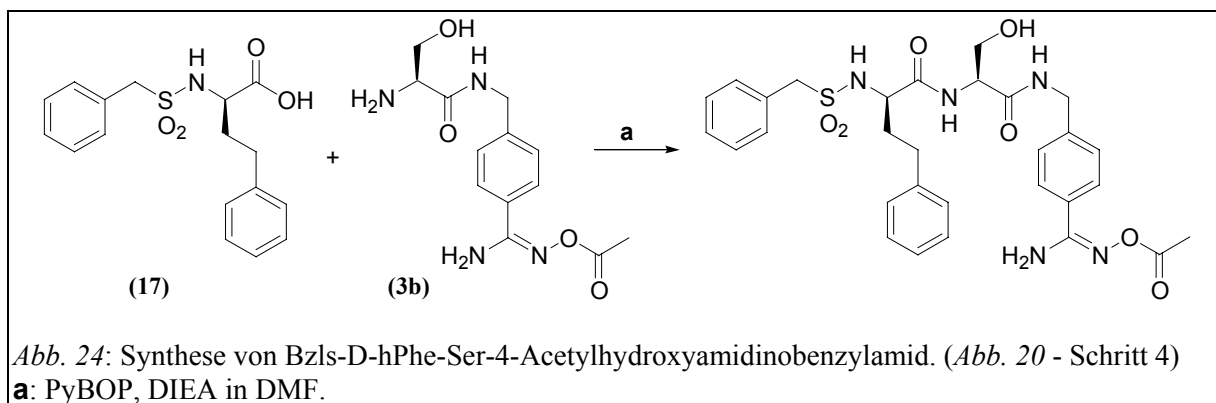


Der P4-P3-Baustein wurde durch Kopplung von Bzls-Cl an H-D-hPhe-OH unter Schotten-Baumann-Bedingungen erhalten (**17**, Abb. 23).

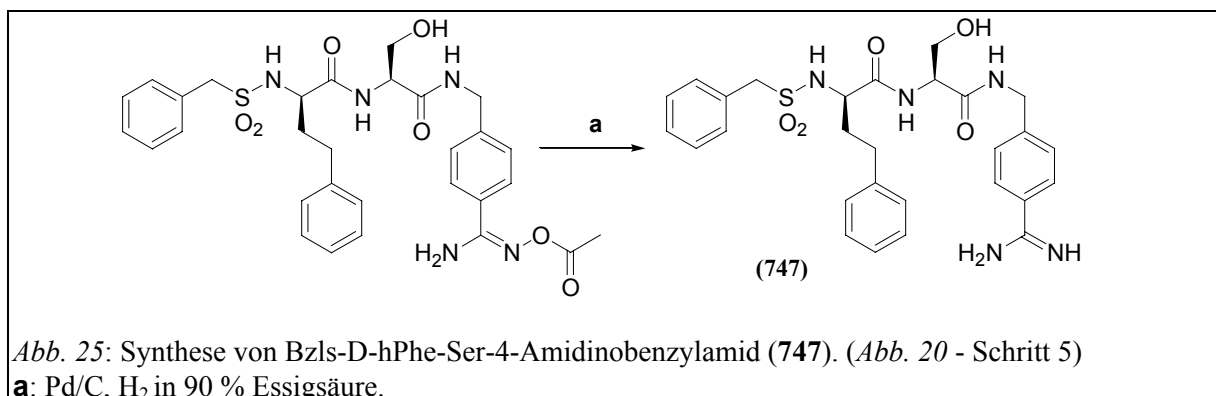


2. Ergebnisse

Der P2-P1-Baustein mit geschützter Amidinofunktion (**3b**, H-Ser-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid) wurde mittels PyBOP an Bzls-D-hPhe-OH (**17**) gekoppelt (*Abb. 24*) [Frérot *et al.*, 1991].



Im letzten Schritt wurde das Zwischenprodukt in 90 % Essigsäure hydriert und der Inhibitor **747** (Bzls-D-hPhe-Ser-4-Amidinobenzylamid) erhalten (*Abb. 25*).



Die Mehrzahl der Hemmstoffe wurde nach einer analogen Synthesestrategie hergestellt. In Fällen, bei denen das P2-P1-Segment mit ungeschützter Amidinofunktion gekoppelt wurde, entfiel die Hydrierung im letzten Schritt (Schritt 5; *Abb. 25*).

2. Ergebnisse

In einigen Fällen, z.B. bei der Synthese des Inhibitors **740** (Bzls-D,L-hAla(4-Pyr)-Gly-4-Amidinobenzylamid), wurde eine modifizierte Syntheseroute verwendet (*Abb. 26*). Diese Strategie wurde in den Fällen angewendet, bei denen die Ausgangsaminosäure nur als Boc-Derivat kommerziell erhältlich war (z.B. Boc-D,L-hAla(4-Pyr)-OH) oder wenn ausschließlich der P4-Rest unter Beibehaltung des P3-P2-P1-Segmentes variiert werden sollte. Die **Schritte 1 und 2** dieser Synthese verliefen analog der in *Abb. 21 und Abb. 22* dargestellten Kopplungen, wobei in diesem Fall Boc-Gly-OH als P2-Aminosäure verwendet wurde. Nach Aufbau des P3-P2-P1-Bausteins (**Schritt 3; Abb. 27**) wurde direkt der Sulfonylrest gekoppelt (**Schritt 4; Abb. 28**) und nach finaler Hydrierung der Inhibitor erhalten (**Schritt 5; Abb. 29**).

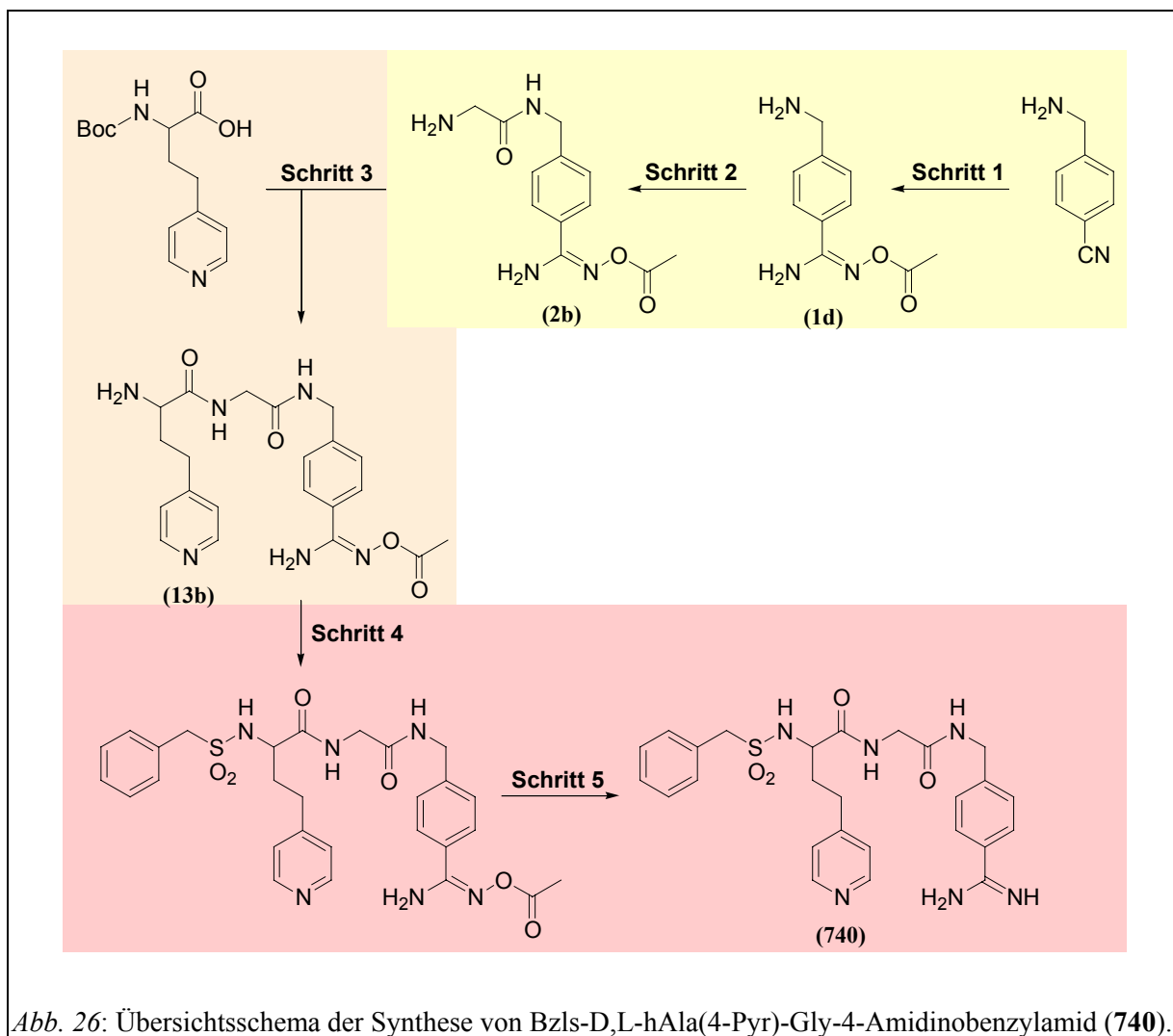
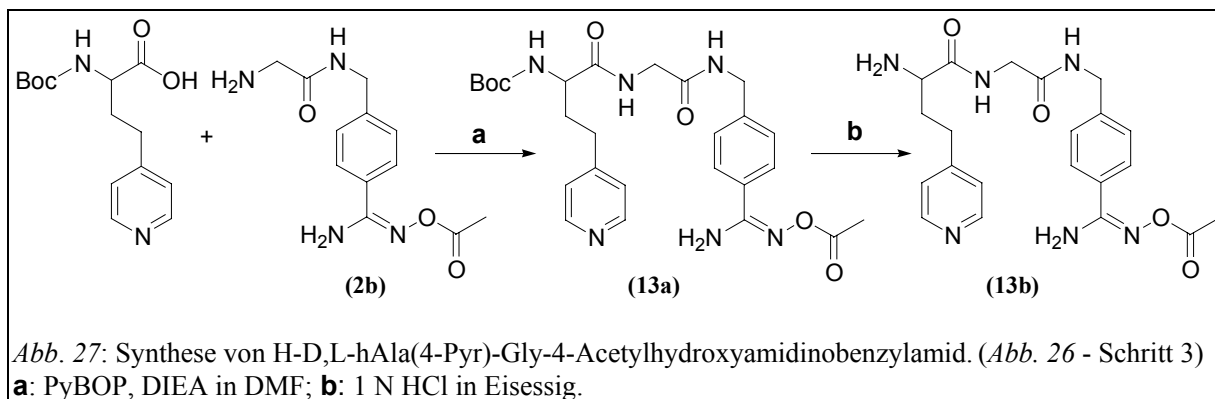


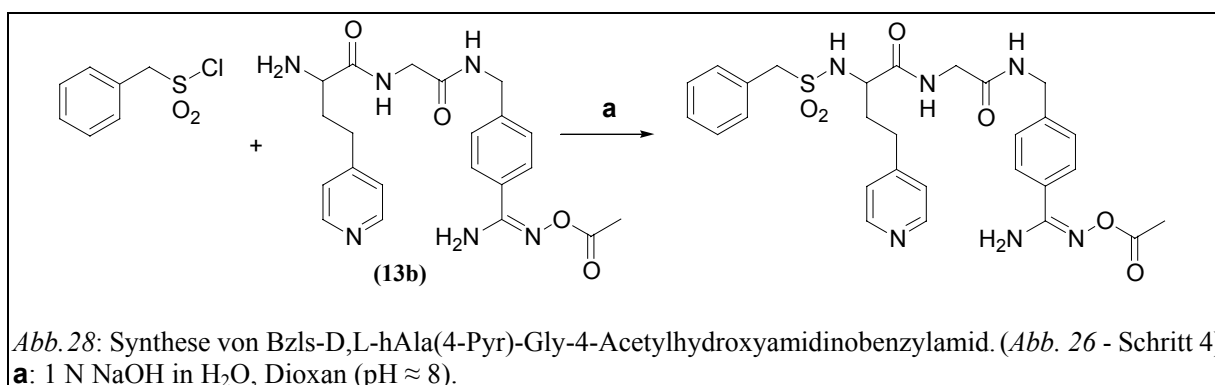
Abb. 26: Übersichtsschema der Synthese von Bzls-D,L-hAla(4-Pyr)-Gly-4-Amidinobenzylamid (**740**).

2. Ergebnisse

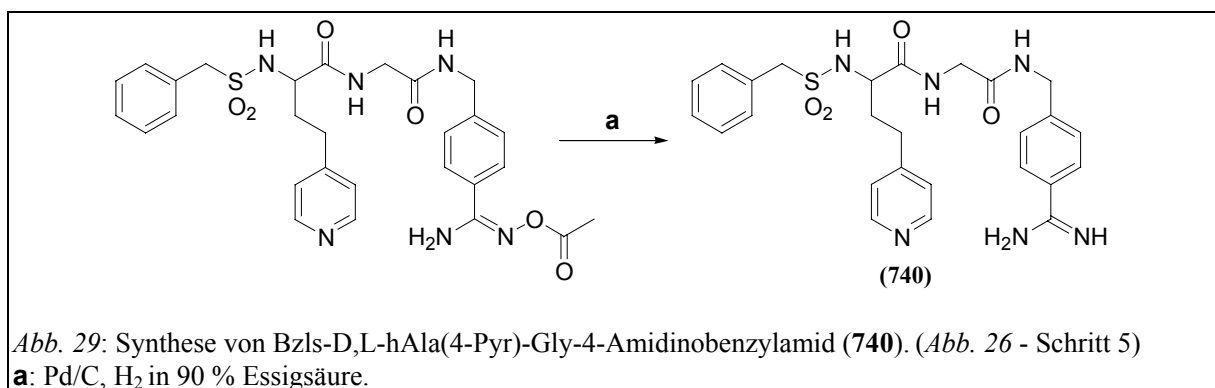
Der P2-P1-Baustein mit geschützter Amidinofunktion (**2b**, H-Gly-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid) wurde mittels PyBOP an Boc-D,L-hAla(4-Pyr)-Gly-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid gekoppelt (**13a**, Abb. 27) [Frérot *et al.*, 1991]. Anschließend wurde vom Intermediat **13a** die N-terminale Boc-Schutzgruppe abgespalten (**13b**, Abb. 27).



Der erhaltene P3-P2-P1-Baustein (**13b**, H-D,L-hAla(4-Pyr)-Gly-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid) wurde unter Schotten-Baumann-Bedingungen mit Bzls-Cl gekoppelt (Abb. 28).

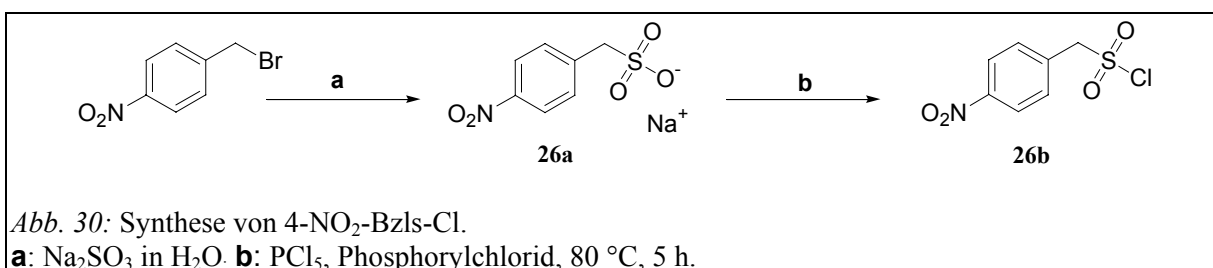


Im letzten Schritt wurde das Zwischenprodukt in 90 % Essigsäure hydriert und der Inhibitor **740** (Bzls-D,L-hAla(4-Pyr)-Gly-4-Amidinobenzylamid) erhalten (Abb. 29).

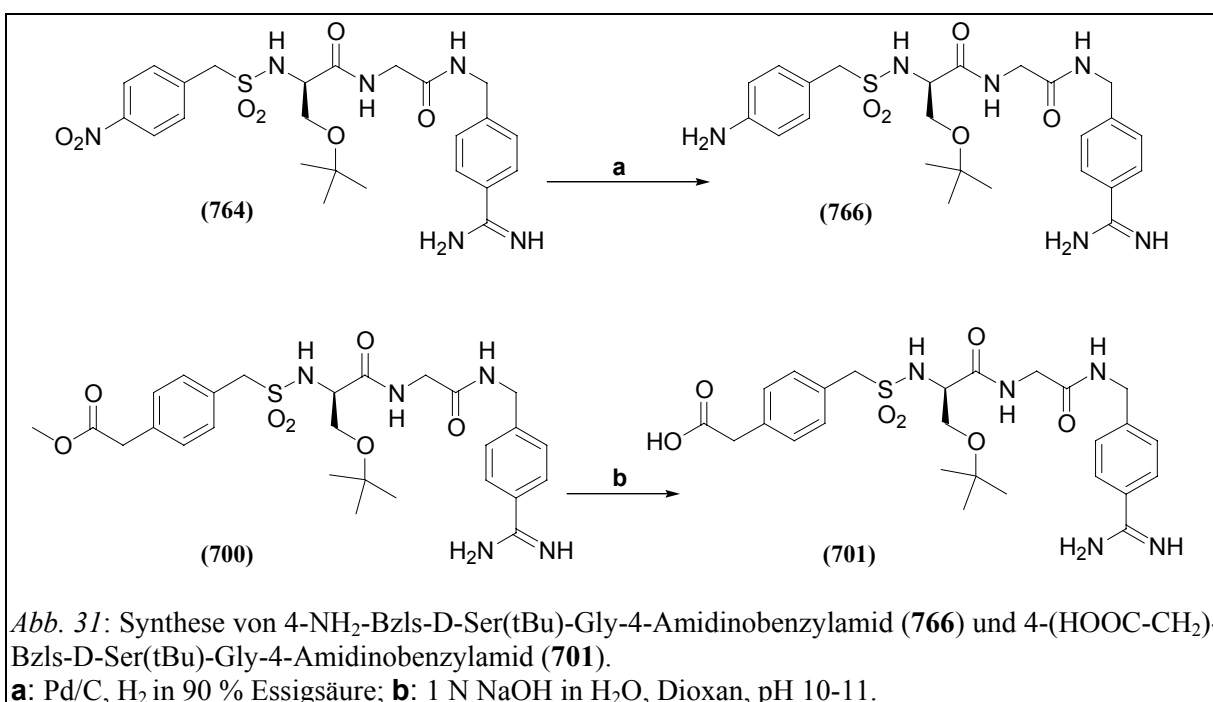


2.1.1. Synthese von Verbindungen mit substituierten Benzylsulfonylresten

Zur Synthese von Verbindungen mit Ring-substituierten Bzls-Resten mussten die nicht kommerziell erhältlichen Sulfonylchloride hergestellt werden. Man erhält die Natriumsalze der Sulfonsäuren durch Umsetzung der entsprechend substituierten Benzylbromide mit Natriumsulfit in Wasser [Arnold u. Dowall, 1948]. Die resultierende Sulfonsäure wird durch Erhitzen mit Phosphorpentachlorid und Phosphorylchlorid in die Sulfonylchloride überführt [Johnson u. Hill, 1914]. Als Beispiel ist in *Abb. 30* die Synthese von 4-NO₂-Bzls-Cl (**26b**) dargestellt, die Synthese anderer Sulfonylchloride verlief analog.

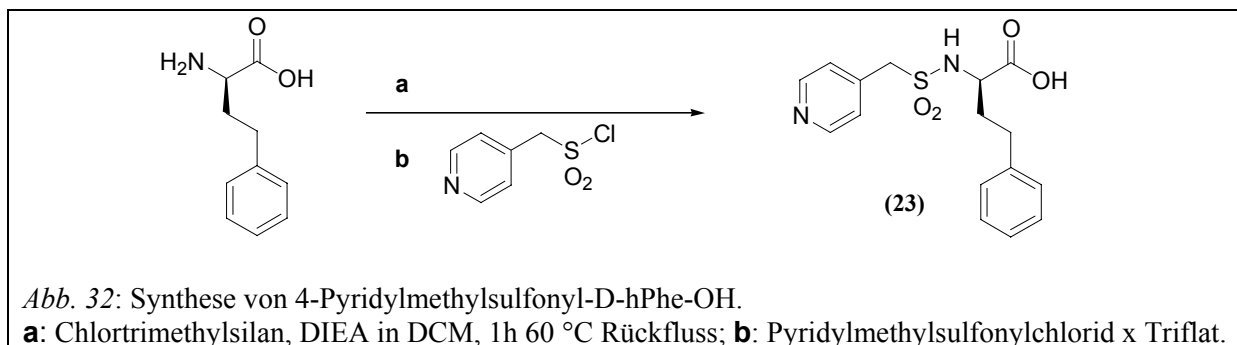


Die Inhibitoren mit Nitrobenzylsulfonylrest wurden im letzten Schritt durch Hydrierung in die korrespondierenden Amino-Verbindungen überführt, während die Hemmstoffe mit einer Methylesterfunktion mit NaOH verseift wurden (*Abb. 31*). Die in *Abb. 31* dargestellten Reaktionen wurden analog mit einer Reihe von Verbindungen mit anderen P3- und P2-Resten durchgeführt.



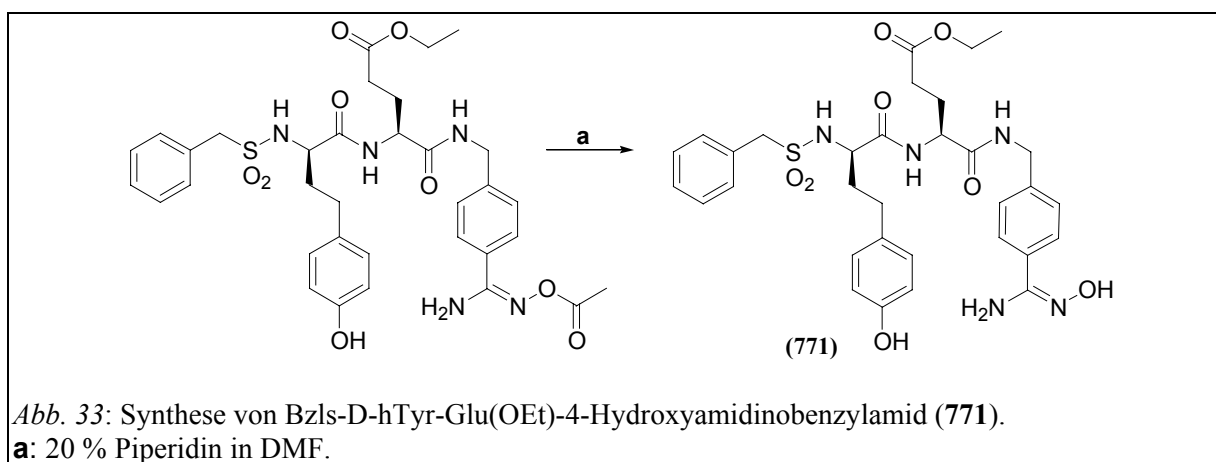
2.1.2. Synthese von Verbindungen mit Pyridylmethylsulfonylresten

Die eingesetzten Pyridylmethylsulfonylchloride waren kommerziell erhältlich (Array Biopharma, Boulder, CO, USA). Da diese Sulfonylchloride in wässrigen Lösungen sehr schnell hydrolysieren [King *et al.*, 1992], wurden sie nach Umsetzung der Aminosäure mit Chlortrimethylsilan in DCM gekoppelt (Abb. 32) [Schwarz *et al.*, 1981].



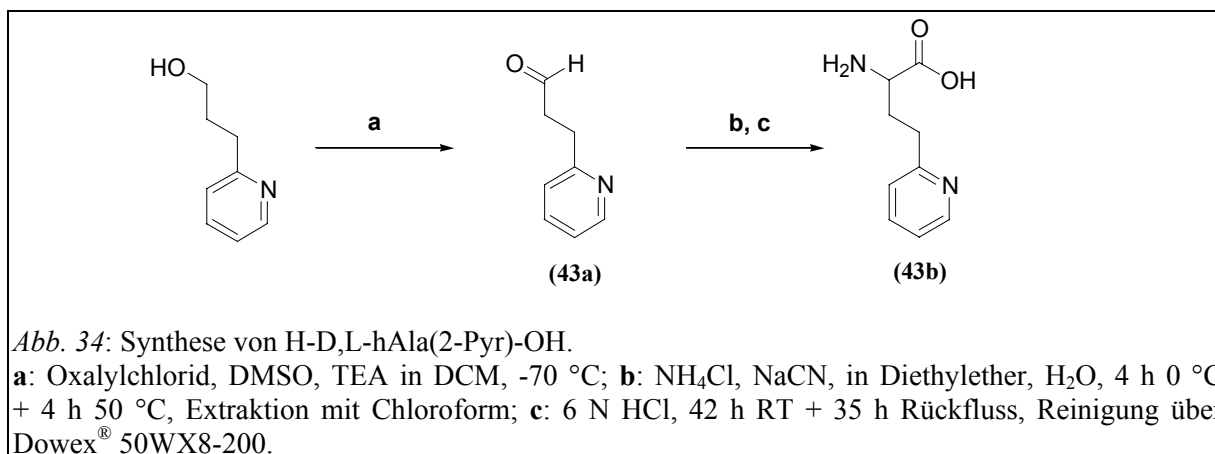
2.1.3. Synthese des Prodrugs 771

Das Prodrug **771** besitzt ein 4-Hydroxyamidinobenzylamid als P1-Rest, das durch Inkubation der Acetylhydroxyamidino-Zwischenstufe mit Piperidin in DMF erhalten wurde (Abb. 33).

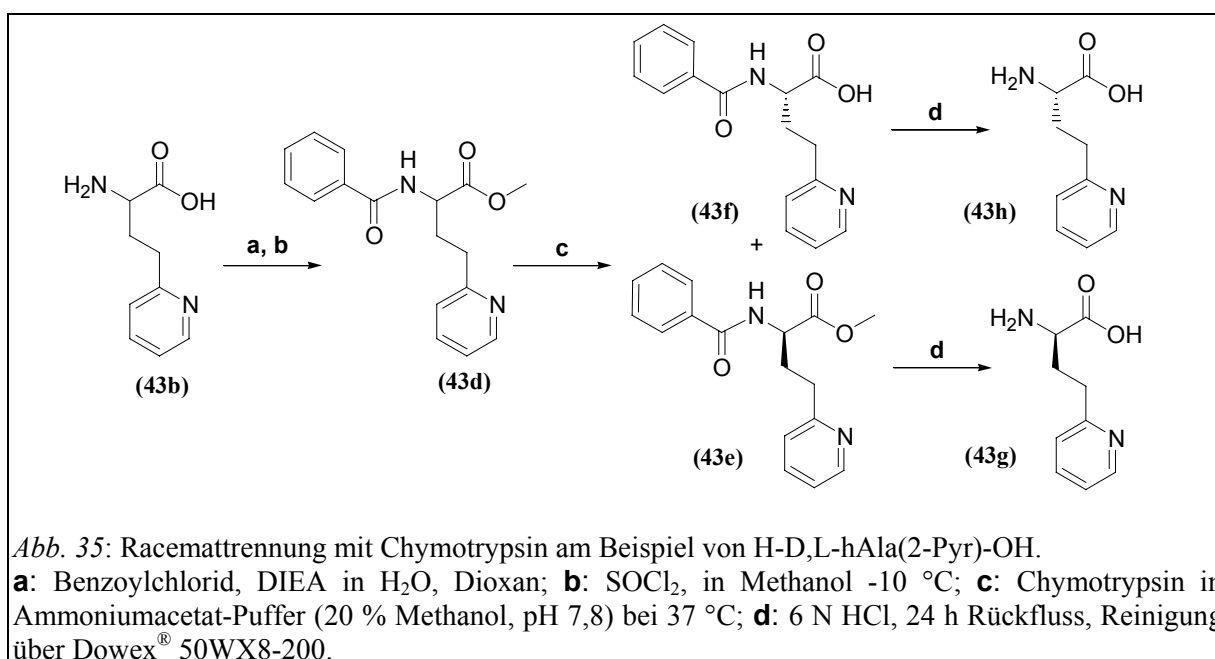


2.1.4. Synthese und Racemattrennung der D,L-Homopyridylalanine

Das für erste Synthesen verwendete Boc-D,L-hAla(4-Pyr)-OH war kommerziell erhältlich (RSP Amino Acids, Shirley, MA, USA), später erfolgte die Herstellung mittels Strecker-Synthese aus 4-Pyridylpropanal, das durch Swern-Oxidation des 4-Pyridylpropanols erhalten wurde [Ratcliffe *et al.*, 1985; Mancuso *et al.*, 1979]. Auf analoge Weise wurden H-D,L-hAla(3-Pyr)-OH und H-D,L-hAla(2-Pyr)-OH (**43b**, Abb. 34) hergestellt.



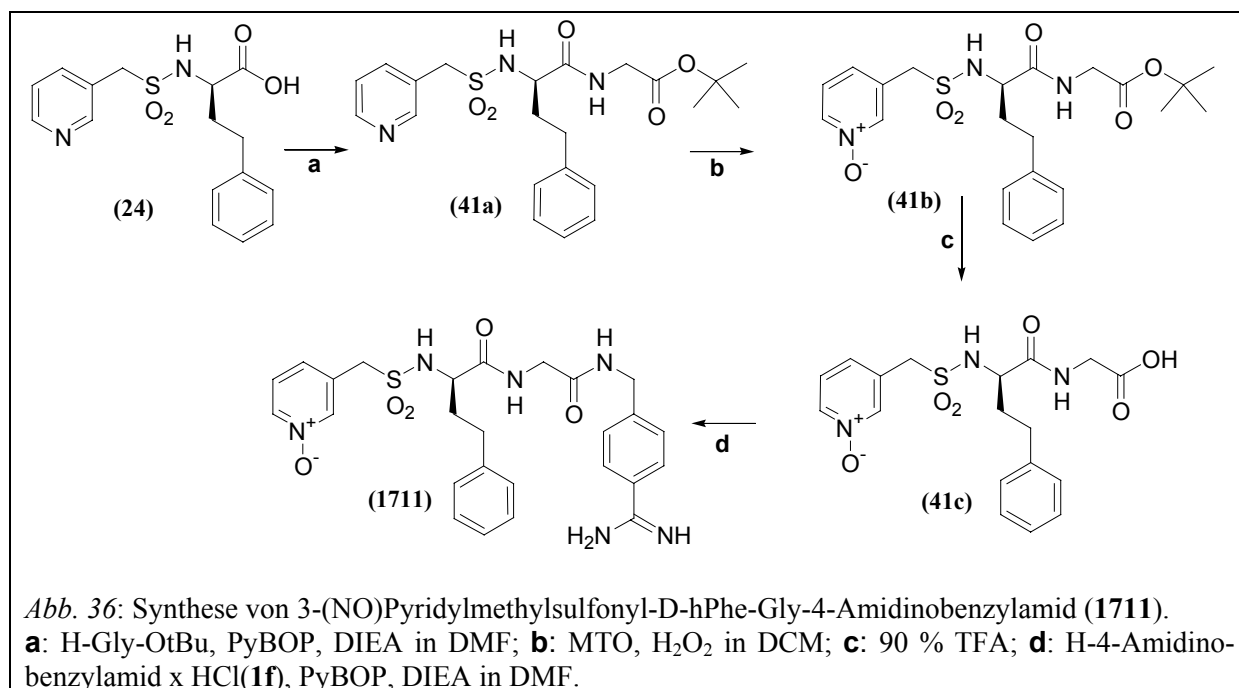
Zur Trennung der Enantiomere wurde das racemische H-D,L-hAla(2-Pyr)-OH (**43b**) in Benzoyl-D,L-hAla(2-Pyr)-OMe (**43d**) überführt und anschließend in Ammoniumacetat-Puffer (20 % Methanol, pH 7,8) mit Chymotrypsin inkubiert (*Abb. 35*). Chymotrypsin spaltet nur Peptid- bzw. Esterbindungen C-terminal von Aminosäuren mit L-Konfiguration, während der Methylester des D-Derivates nicht angegriffen wird. Nach Entfernen des Methanols und teilweisem Einengen fiel bei pH 8,5 nur der Methylester des D-Derivates aus und konnte so von der L-Verbindung mit freier Carboxylgruppe abgetrennt werden [Ratcliffe *et al.*, 1985]. Die Benzoyl-Verbindungen (**43e**, **43f**) wurden mit 6 N HCl hydrolysiert und die Enantiomere mittels Ionenaustauschchromatographie isoliert (**43g**, **43h**; *Abb. 35*). Die Racemattrennung des 3- und 4-Homopyridylalanins erfolgte analog.



Die erhaltenen Aminosäuren wurden mit Marfey's Reagenz auf ihre Enantiomerenreinheit überprüft [Kochhar u. Christen, 1989]. Durch Kopplung der Aminosäuren mit dem chiralen Marfey's Reagenz entstehen Diastereomere, die mittels RP-HPLC bei 220 oder 340 nm nachweisbar sind. Dabei zeigte sich, dass das erhaltene D-Derivat zu etwa 5 % mit L-Aminosäure verunreinigt war; in der L-Aminosäure-Fraktion waren ca. 15 % D-Derivat enthalten.

2.1.5. Synthese der Pyridyl-N-Oxid-Derivate

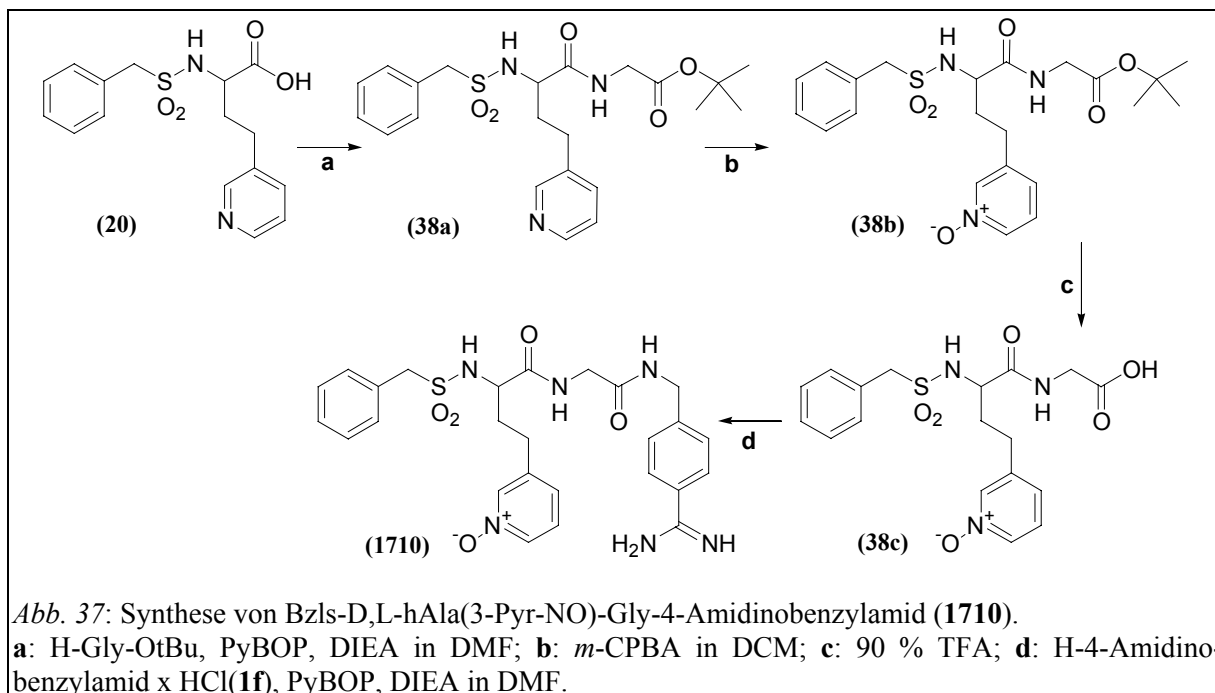
Um den Stickstoff des Pyridylmethylsulfonylrestes in das N-Oxid⁵ zu überführen, wurde eine andere Synthesestrategie gewählt (Abb. 36). Zuerst wurde der entsprechende P4-P3-Baustein (**24**) mittels PyBOP an H-Gly-OtBu gekoppelt (**41a**). Der Pyridin-Stickstoff des intermediären 3-Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-Gly-OtBu wurde mit MTO (Methyl-Rhenium-Trioxid) und 50 % Wasserstoffperoxid zum das N-Oxid oxidiert [Copéret *et al.*, 1998] und anschließend die C-terminale tBu-Schutzgruppe mit 90 % TFA abgespalten (**41c**). Das resultierende 3-(NO)Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-Gly-OH wurde im letzten Schritt direkt an freies H-4-Amidinobenzylamin (**1f**) gekoppelt, da die N-Oxid-Funktion bei Hydrierung oder Reduktion nicht stabil ist. Auf diesem Weg wurden auch die anderen (NO)Pyridylmethylsulfonyl-Verbindungen synthetisiert.



⁵ In vielen Fällen wird die N-Oxid-Funktion als Zwitterion (N⁺-O⁻) dargestellt [z.B. Guertin *et al.*, 2002; Haginoya *et al.*, 2004b]. Alternativ wird diese Gruppe auch mit einer Dativbindung N→O gezeigt, die eine Delokalisierung der Elektronen hin zum Sauerstoff beschreibt [z.B. Young *et al.*, 2004]. In dieser Arbeit sind alle Pyridyl-N-Oxide als Zwitterionen dargestellt.

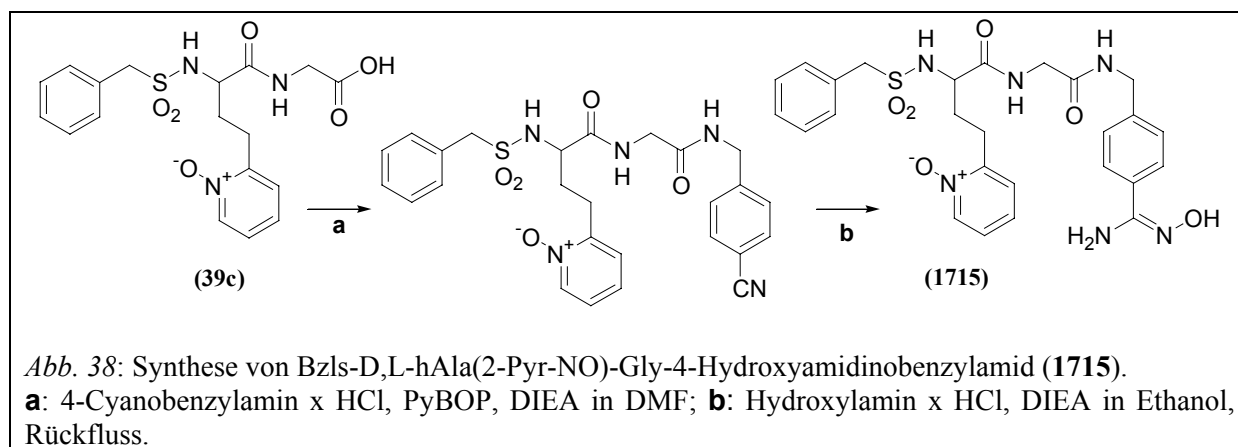
2. Ergebnisse

Die Synthese der Homopyridylalanin-N-Oxid-Verbindungen erfolgte ebenfalls über die Oxidation der C-terminal geschützten P4-P3-P2-Zwischenstufe (**38a**, Abb. 37). Diese gelang mit besseren Ausbeuten unter Verwendung des Oxidationsmittels *meta*-Chlorperoxybenzoesäure (*m*-CPBA) anstelle von MTO/H₂O₂ [Bremner *et al.*, 1997a, 1997 b].



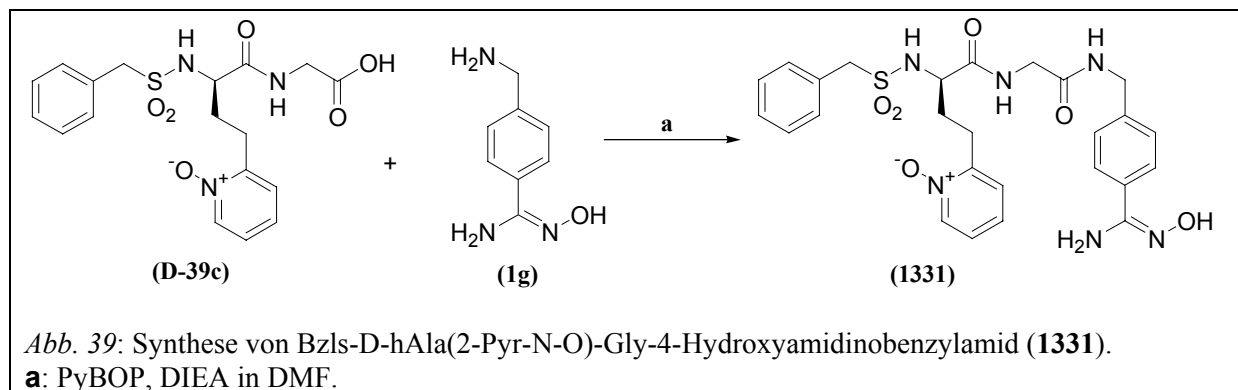
2.1.6. Synthese der Prodrugs 1715 und 1331

Die racemische Verbindung **1715** entstand durch Kopplung des P4-P3-P2-N-Oxid-Bausteines **39c** an 4-Cyanobenzylamin. Das Intermediat wurde durch Umsetzung mit Hydroxylamin in die Hydroxyamidino-Verbindung überführt (Abb. 38).



2. Ergebnisse

Das Prodrug **1331** mit D-hAla(2-Pyr-NO) als P3-Rest wurde nach einer modifizierten Synthesestrategie hergestellt. In diesem Fall wurde der gewünschte 4-Hydroxy-amidinobenzylamin-Baustein (**1g**) im letzten Schritt mittels PyBOP direkt an Bzls-D-hAla(2-Pyr-NO)-Gly-OH (**D-39c**) gekoppelt (Abb. 39).



2.2. Enzymkinetische Messungen und Untersuchung des Eliminationsverhaltens

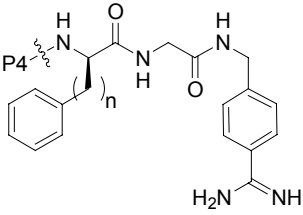
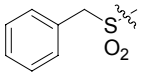
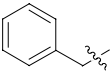
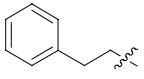
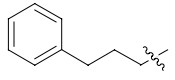
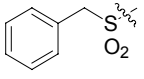
Im Rahmen dieser Dissertation wurden hauptsächlich Inhibitoren synthetisiert und charakterisiert, die sich von der Leitstruktur **802** mit einem D-Homophenylalanin in P3-Position ableiten (Tab. 2). Zusätzlich wurden einige Verbindungen mit D-Phenylalanin-Derivaten synthetisiert, da diese im Gegensatz zu den D-hPhe-Derivaten kommerziell erhältlich waren.

2.2.1. Inhibitoren ohne Sulfonylfunktion

Zu Beginn der Arbeiten wurde versucht, die Sulfonylfunktion im P4-Rest der Inhibitoren zu eliminieren und durch eine CH₂-Gruppe zu ersetzen. Das Ziel dieser Substitution war, das Molekulargewicht der Verbindungen und die Anzahl der Heteroatome zu reduzieren. In Kombination mit D-Phe als P3-Aminosäure wurde ausgehend von Verbindung **635** der Bzls-Rest durch unterschiedlich lange Phenylalkylketten ersetzt (**718**, **719** und **726**). Im Falle des Inhibitors **755** wurde der Bzls-Rest vollständig entfernt (Tab. 3).

2. Ergebnisse

Tab. 3 - Hemmkonstanten der Inhibitoren ohne Sulfonylfunktion mit D-Phe / D-hPhe in P3-Position.

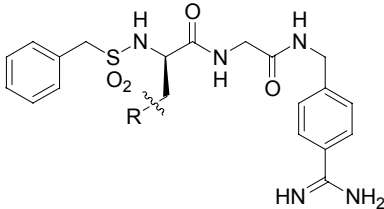

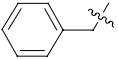
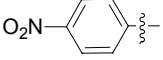
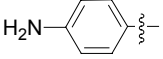

Nr.							
	P4	n	K _i (μM)				
			FXa	Thrombin	Plasmin	uPA	Trypsin
635 (Tab. 2)		1	0,078	0,068	1,2	0,9	0,038
718		1	5,7	1,2	> 1000	26	0,44
719		1	4,2	2,2	> 1000	40	0,35
726		1	14	1,6	47	30	0,44
802 (Tab. 2)		2	0,006	0,047	1,1	0,91	0,011
755	H	2	3,6	16	40	43	0,37

Alle Derivate ohne Sulfonylfunktion zeigen mit K_i-Werten $\geq 3,6 \mu\text{M}$ einen fast vollständigen Verlust der FXa-Hemmaktivität. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die Sulfonylfunktion essentiell für die Aktivität der Hemmstoffe ist. Deshalb wurde der Bzls-Rest in P4-Position für alle folgenden Inhibitorsynthesen beibehalten.

2.2.2. Inhibitoren mit Derivaten des D-Phenylalanins

In einer weiteren Serie wurde als P3-Aminosäure 4-Nitro- bzw. 4-Aminophenylalanin und 3-Pyridylalanin (jeweils in D-Konfiguration) eingebaut (Tab. 4).

Tab. 4 - Hemmkonstanten der Inhibitoren mit D-Phe-Analoga in P3-Position.

Nr.		K _i (μM)				
		R				
		FXa	Thrombin	Plasmin	uPA	Trypsin
635 (Tab. 2)		0,078	0,068	1,2	0,9	0,038
802 (Tab. 2)		0,006	0,047	1,1	0,91	0,011
784		0,16	0,32	1,2	1,2	0,1
785		0,17	0,25	0,92	1,5	0,056
725		0,051	0,28	1,2	0,87	0,067

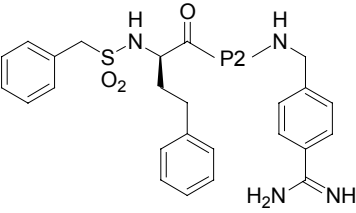
Die Inhibitoren mit Nitro- (**784**) bzw. Aminogruppe (**785**) zeigen eine vergleichsweise schwache FXa-Hemmung mit K_i-Werten > 0,15 μM. Auch das D-Ala(3-Pyr)-Derivat **725** ist mit einer Hemmkonstante von 51 nM weniger wirksam als die D-hPhe-Verbindung **802** und kaum wirksamer als der D-Phe-Inhibitor **635**. Deshalb wurden keine weiteren Verbindungen mit D-Phe-Analoga in P3-Position synthetisiert.

2.2.3. Inhibitoren mit D-Homophenylalanin

Aus Arbeiten mit strukturell ähnlichen Urokinasehemmstoffen war bekannt, dass der Einbau hydrophiler und polarer Gruppen in vielen Fällen zu Verbindungen mit verzögerter Eliminationsgeschwindigkeit führt [Schweinitz *et al.*, 2004]. Daher wurde versucht, diese Strategie auch auf die FXa-Inhibitoren anzuwenden. Ausgehend von Inhibitor **802** wurden durch Variation der P2-Aminosäure mit polaren Seitenketten die Verbindungen **747** mit Ser und **768** mit Glu erhalten.

2. Ergebnisse

Tab. 5 - Hemmkonstanten der Inhibitoren mit D-hPhe in P3-Position und verschiedenen P2-Resten.

Nr.						
	P2	K _i (μM)				
		FXa	Thrombin	Plasmin	uPA	Trypsin
802 (Tab. 2)	Gly	0,006	0,047	1,1	0,91	0,011
747	Ser	0,036	0,55	0,061	0,38	0,0024
768	Glu	0,0095	15	0,23	4,8	0,002

Beide Substanzen sind mit K_i-Werten von 36 bzw. 9,5 nM weniger wirksam als die Ausgangssubstanz **802**, jedoch ist das Glu-Derivat **768** noch ein relativ starker und selektiver FXa-Hemmstoff. Im Gegensatz dazu führte der Einbau von Ser bei Verbindung **747** zu einem deutlicheren Selektivitätsverlust (K_i Plasmin = 61 nM). Allerdings zeigt der Inhibitor **747** eine verlangsamte Eliminierung (Abb. 40).

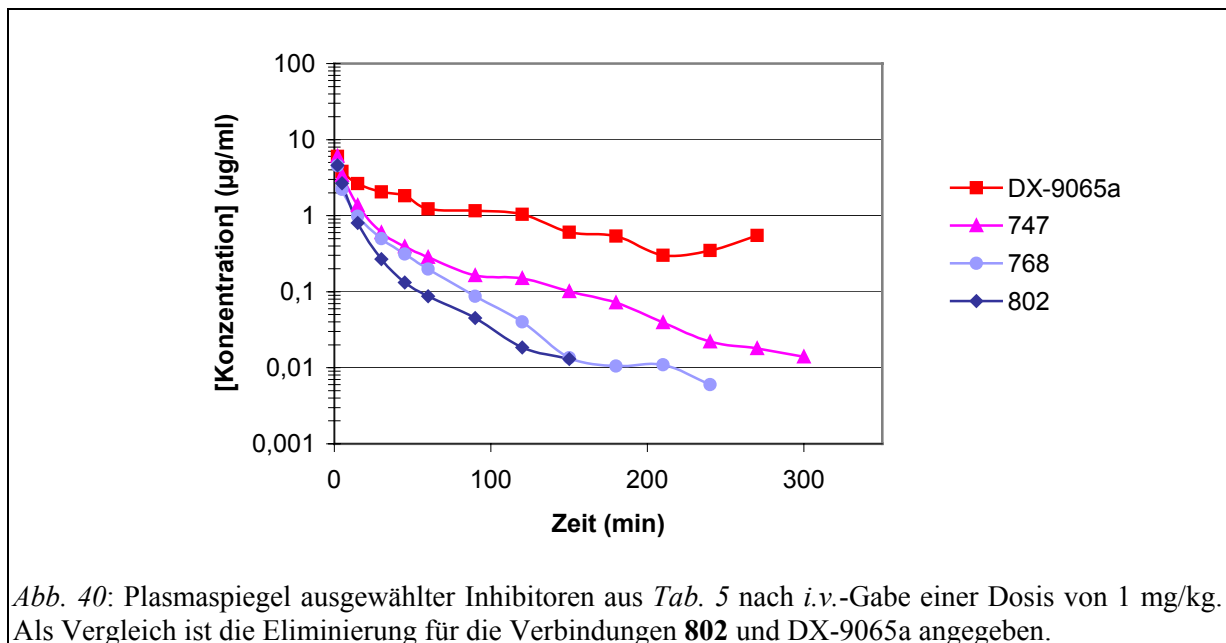
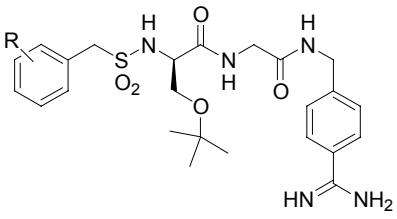
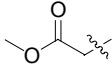
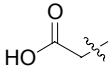


Abb. 40: Plasmaspiegel ausgewählter Inhibitoren aus Tab. 5 nach i.v.-Gabe einer Dosis von 1 mg/kg. Als Vergleich ist die Eliminierung für die Verbindungen **802** und DX-9065a angegeben.

2. Ergebnisse

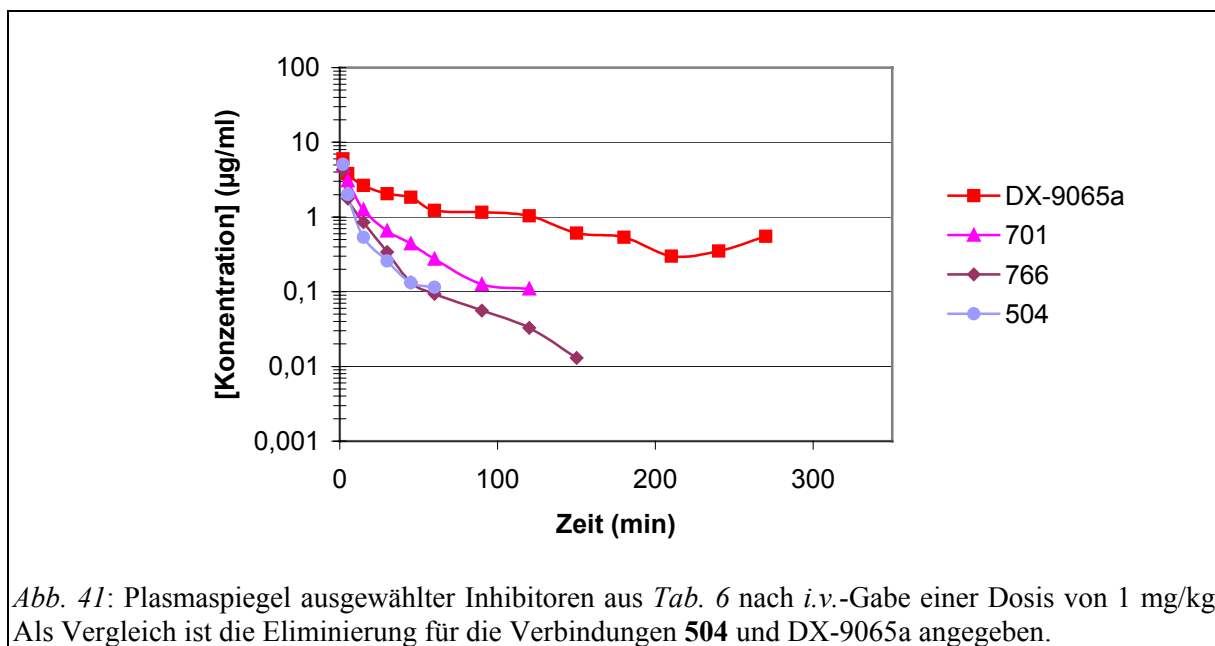
In der Regel führt der Austausch des Gly in P2-Position durch andere Aminosäuren zu einem deutlichen Verlust an Selektivität und Wirksamkeit. Deshalb wurde in einer weiteren Serie versucht, unter Beibehaltung des Glycins den P4-Ring mit polaren Gruppen zu modifizieren. Um eine direkte Vergleichbarkeit mit früheren Ergebnissen zu ermöglichen, wurde in einer ersten Reihe ausgehend von Verbindung **504** der D-Ser(tBu)-Rest in P3-Position beibehalten und der P4-Ring mit Carboxyl-, Nitro- und Aminogruppen modifiziert (*Tab. 6*).

Tab. 6 - Hemmkonstanten der Inhibitoren mit D-Ser(tBu) in P3-Position und substituierten P4-Resten.

Nr.						
	R	K _i (μM)				
		FXa	Thrombin	Plasmin	uPA	Trypsin
504 (<i>Tab. 1</i>)	H	0,014	0,22	7,7	1,2	0,066
700*		0,11	0,27	4,6	0,89	0,027
701*		0,098	2,5	7,3	2,1	0,068
764	4-NO ₂	0,0075	0,14	3,5	0,059	0,053
766	4-NH ₂	0,018	0,077	2,9	0,59	0,02
753	2-NO ₂	0,097	0,2	9,9	3,0	0,14
754	2-NH ₂	0,023	0,12	8,7	2,8	0,071

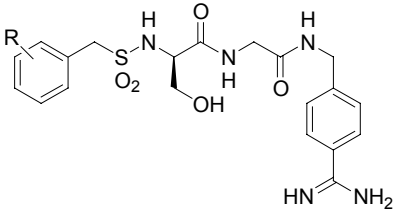
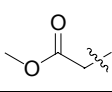
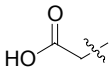
(* R: Substitution in *para*-Position am P4-Phenylring)

Die entstandenen Nitro- bzw. Amino-Verbindungen **764**, **766** und **754** besitzen ähnliche Aktivitäten wie Inhibitor **504**, während die Verbindungen **753**, **700** und **701** FXa deutlich schwächer hemmen. Allerdings konnte nur für das Derivat **701** eine verlangsamte Eliminierung beobachtet werden (*Abb. 41*). Der Effekt der Nitrogruppen auf die Eliminationsgeschwindigkeit der Hemmstoffe wurde in diesen Kombinationen mit D-Ser(tBu) in P3-Position nicht untersucht.



Im Rahmen dieser Synthesen entstanden als zusätzliche Produkte nach Abspaltung der tBu-Schutzgruppe des Serins mit 90 % TFA die Substanzen **705**, **706**, **765**, **767**, **756** und **757** (Tab. 7).

Tab. 7 - Hemmkonstanten der Inhibitoren mit D-Ser in P3-Position und substituierten P4-Resten.

Nr.		K_i (μM)				
		FXa	Thrombin	Plasmin	uPA	Trypsin
705*		10,4	9,9	18	0,036	0,089
706*		48	60	27	0,11	0,21
765	4-NO ₂	5,9	12	9,7	0,024	0,18
767	4-NH ₂	1,4	6,7	6,2	0,018	0,056
756	2-NO ₂	10,2	14	21	0,13	n.b.
757	2-NH ₂	4	10,9	16	0,037	0,18

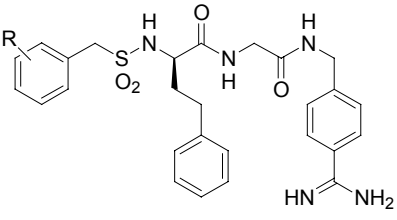
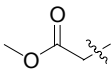
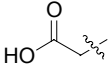
(* R: Substitution in *para*-Position am P4-Phenylring; n.b. = nicht bestimmt)

2. Ergebnisse

Diese Verbindungen zeigen einen starken Verlust der FXa-Hemmwirkung (K_i -Werte $> 1,0 \mu\text{M}$). Wie zu erwarten war, steigt statt dessen die Aktivität gegenüber uPA deutlich an [Schweinitz *et al.*, 2004]. Dies bestätigt, dass eine hydrophobe Seitenkette in P3-Position für eine starke Hemmwirkung gegenüber FXa wichtig ist.

In Analogie zu den D-Ser(tBu)-Derivaten wurden die P4-Variationen in Verbindung mit D-hPhe als P3-Aminosäure untersucht. Die Hemmkonstanten der Inhibitoren sind in *Tab. 8* zusammengefasst.

Tab. 8 - Hemmkonstanten der Inhibitoren mit D-hPhe in P3-Position und substituierten P4-Resten.

Nr.						
	R	K_i (μM)				
		FXa	Thrombin	Plasmin	uPA	Trypsin
802 (<i>Tab. 2</i>)	H	0,006	0,047	1,1	0,91	0,011
738*		0,054	1,8	1,8	1,7	0,01
739*		0,09	14	3,8	33	0,03
759	4-NO ₂	0,014	0,71	1,5	0,66	0,02
751	2-NO ₂	0,022	1,2	3,1	5,2	0,04
760	4-NH ₂	0,0032	0,26	0,88	0,41	0,0073
769	3-NH ₂	0,014	1,4	0,93	2,0	0,015
752	2-NH ₂	0,0086	0,92	1,3	2,1	0,021

(* R: Substitution in *para*-Position am P4-Phenylring)

Die Inhibitoren mit Nitro- und Carboxymethyl-Substitution in P4-Position (**751**, **759** und **739**) sind weniger wirksam als die Leitsubstanz **802**. Allerdings konnte die FXa-Hemmwirkung durch Reduktion der Nitro- zur Aminogruppe (**760**, **769** und **752**; K_i -Werte $\leq 8,6 \text{ nM}$) deutlich verbessert werden. Diese Substitutionen hatten jedoch keinen Effekt auf die Eliminationsgeschwindigkeit der Inhibitoren (*Abb. 42*).

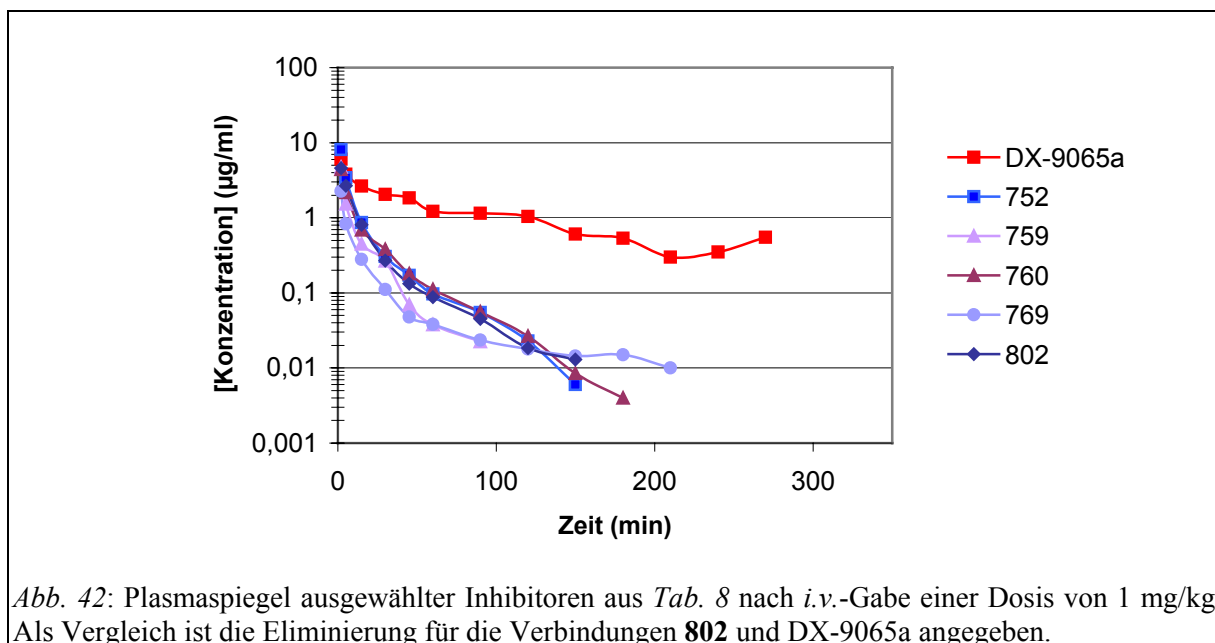


Abb. 42: Plasmaspiegel ausgewählter Inhibitoren aus Tab. 8 nach *i.v.*-Gabe einer Dosis von 1 mg/kg. Als Vergleich ist die Eliminierung für die Verbindungen **802** und DX-9065a angegeben.

Aufgrund der starken Hemmwirkung der Amino-substituierten Derivate auf FXa wurde mit Verbindung **760** bei der Firma GenPharmTox BioTech AG, München, ein Ames-Test durchgeführt [Ames *et al.*, 1975; Maron u. Ames, 1983]. Dieser diente dazu, die potentiellen mutagenen Eigenschaften der anilinschen Aminogruppe in P4-Position zu untersuchen. Dabei zeigten sich starke zytotoxische Effekte des Hemmstoffes und eine deutliche mutagene Wirkung, die bei einem strukturell ähnlichen Inhibitor ohne Substitution am P4-Rest (Bzls-D-Ser-Ser-4-Amidinobenzylamid⁶) nicht beobachtet wurden.

Die Ergebnisse aus dem Ames Test erforderten die Entwicklung alternativer Hemmstoffe. Stark basische Reste sind als Substituenten ungeeignet, da Inhibitoren mit bis-basischem Charakter kaum oral resorbierbar sind und schwere Nebenwirkungen, wie starken Blutdruckabfall, verursachen können [Kaiser *et al.*, 1987; Pallottini *et al.*, 2002]. Eine gängige Alternative ist der Austausch von Phenyl- durch Pyridylringe, die nur eine relativ geringe Basizität besitzen ($pK_a = 5,2$) [Patai u. Rappoport, 1991] und so bei physiologischem pH-Wert nur z.T. geladen sind. Solche Pyridyl-Substituenten erhöhen die Hydrophilie und dadurch auch die Löslichkeit der Verbindungen und können so die Eliminationsgeschwindigkeit beeinflussen.

Durch Substitution der Benzylsulfonylfunktion mit verschiedenen Pyridylmethylsulfonylgruppen wurden die Verbindungen **741**, **748** und **749** erhalten (Tab. 9).

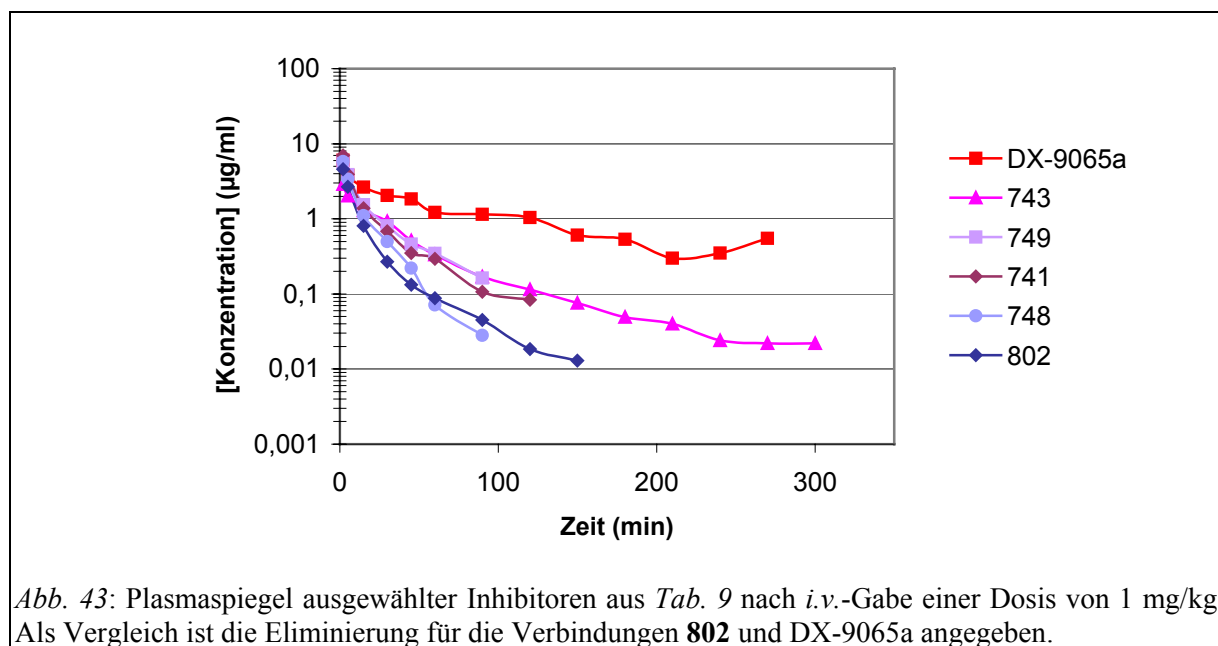
⁶ uPA-Hemmstoff [Schweinitz *et al.*, 2004]

2. Ergebnisse

Tab. 9 - Hemmkonstanten der Inhibitoren mit D-hPhe in P3-Position und P4-Pyridylgruppen.

Nr.							
	R	P2	K _i (μM)				
			FXa	Thrombin	Plasmin	uPA	Trypsin
741		Gly	0,086	3,6	5,1	2,5	0,032
748		Gly	0,078	5,9	3,7	7,4	0,045
749		Gly	0,093	4,9	4,7	12	0,043
743		Ser	0,38	3,3	0,27	0,7	0,006

Alle Inhibitoren dieser Serie sind relativ schwache FXa-Hemmstoffe ($K_i \geq 78$ nM). In Kombination mit Ser als P2-Aminosäure (**743**) kam es zu einem noch stärkeren Wirkungsverlust gegenüber FXa, verbunden mit einem Anstieg der Plasmin- und uPA-Hemmaktivität. Bei der Untersuchung der Pharmakokinetik zeigte sich, dass die Derivate **741**, **749** und **743** ein etwas verlangsamtes Eliminationsprofil besitzen (Abb. 43).



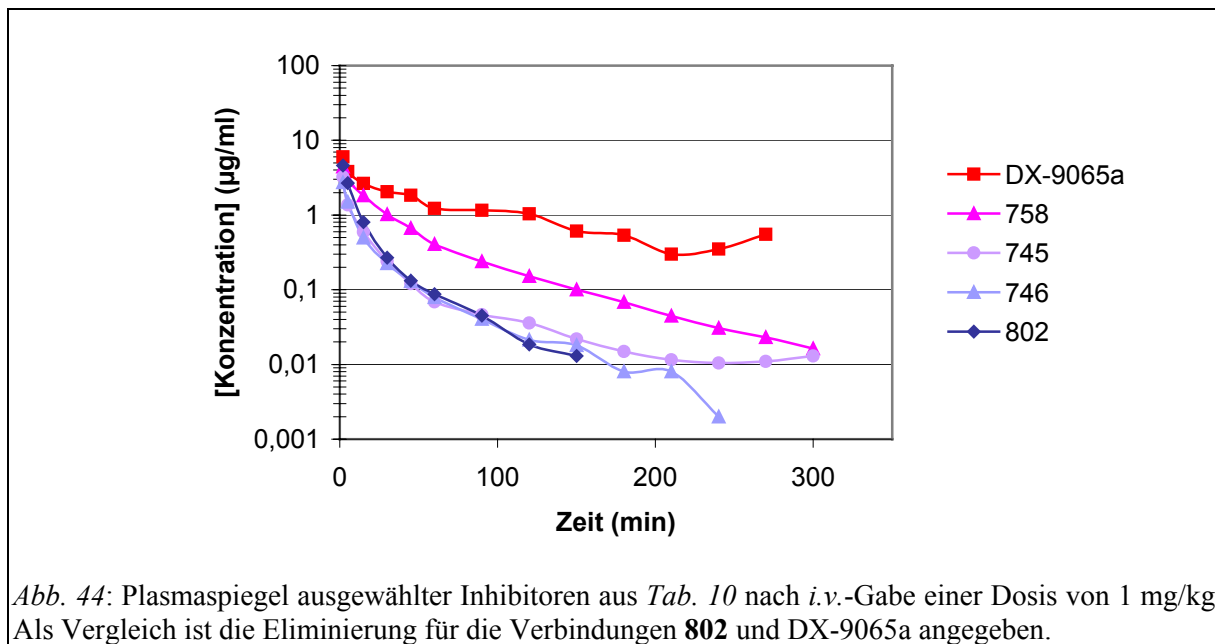
2.2.4. Inhibitoren mit D-Homotyrosin

Da nach Variation der P4- und P2-Position in Verbindung mit D-hPhe keine Verbesserung der Hemmwirkung in Kombination mit einer verzögerten Eliminierung möglich war, wurde das D-hPhe in P3-Position modifiziert. In einer ersten Serie wurden Derivate mit kommerziell erhältlichem D-hTyr synthetisiert (Tab. 10).

Tab. 10 - Hemmkonstanten der Inhibitoren mit D-hTyr in P3-Position und verschiedenen P2-Resten.

Nr.						
	P2	K _i (μM)				
		FXa	Thrombin	Plasmin	uPA	Trypsin
745	Gly	0,003	1,5	0,78	0,93	0,0039
746	Ser	0,012	1,4	0,048	0,24	0,0016
758	Glu	0,0031	19	0,15	3,6	0,026

Inhibitor **745** mit Gly als P2-Rest ist ein wirksamer ($K_i = 3,0$ nM) und sehr selektiver FXa-Hemmstoff. Auch in dieser Reihe führte der Einbau von Ser als P2-Aminosäure in Verbindung **746** zu einem deutlichen Verlust der Selektivität gegenüber Plasmin. Im Gegensatz zu den Inhibitoren mit Gly (**745**) und Ser (**746**) in P2-Position zeigt das Glu-Derivat **758** neben einer starken Hemmwirkung ($K_i = 3,1$ nM) auch eine verzögerte Eliminationsgeschwindigkeit (Abb. 44).



Um einen oral wirksamen FXa-Hemmstoff zu erhalten, wurden von Verbindung **758** die zwei Prodrug-Derivate **763** und **771** hergestellt. Das Ziel von Prodrug-Verbindungen ist, die stark geladenen Gruppen des Wirkstoffs durch leicht abspaltbare hydrophobe Reste zu maskieren, so dass eine Resorption nach oraler Applikation ermöglicht wird.

Das Prodrug hat in der Regel nur eine sehr geringe Wirksamkeit zum Zielenzym und demzufolge auch zu anderen ähnlichen Enzymen, wie z.B. Trypsin. Erst nach der Resorption in die Blutbahn wird die Prodrug-Verbindung durch körpereigene Enzyme oder spontan ablaufende Prozesse in den aktiven Inhibitor überführt. Somit wird die freie Inhibitor-konzentration nicht durch Trypsin beeinflusst, welches in hohen Konzentrationen im Gastrointestinaltrakt vorkommt.

Die Carboxylfunktion der Glutaminsäure wurde als Ethylester maskiert, welcher im Blut durch Esterasen hydrolysiert wird [Ettmayer *et al.*, 2004]. Die Amidinogruppe wurde in eine Hydroxyamidinogruppe überführt. Diese Hydroxybenzamidine werden bei der ersten Leberpassage (*first pass effect*) durch eine NADH-abhängige Reduktase in das freie Amidin umgewandelt [Clement *et al.*, 1997].

2. Ergebnisse

Tab. 11 - Hemmkonstanten des Inhibitors **758** und seiner Prodrugs mit D-hTyr in P3-Position.

Nr.							
	R ₁	R ₂	K _i (μM)				
			FXa	Thrombin	Plasmin	uPA	Trypsin
758	H	H	0,0031	19	0,16	3,6	0,026
763	CH ₂ CH ₃	H	0,0032	1,0	0,011	0,23	0,0016
771	CH ₂ CH ₃	OH	1,9	> 1000	130	> 1000	6,5

Das doppelte Prodrug **771** besitzt aufgrund der modifizierten Amidinofunktion bei allen untersuchten Enzymen eine mehr als 500-fach geringere Wirksamkeit. Ein Nachteil des Mono-Prodrugs **763** mit freier Amidinogruppe ist der Selektivitätsverlust gegenüber Plasmin ($K_{i \text{ Plasmin}} = 11 \text{ nM}$). Um die Hydrolysegeschwindigkeit des Ethylesters zu untersuchen, wurde die Verbindung **763** bei 25 °C mit Rattenplasma inkubiert. Durch Bestimmung der Plasmakonzentrationen des Prodrugs **763** und der Wirksubstanz **758** zeigte sich, dass der Ethylester praktisch sofort hydrolysiert und die Verbindung **758** gebildet wird (Abb. 45).

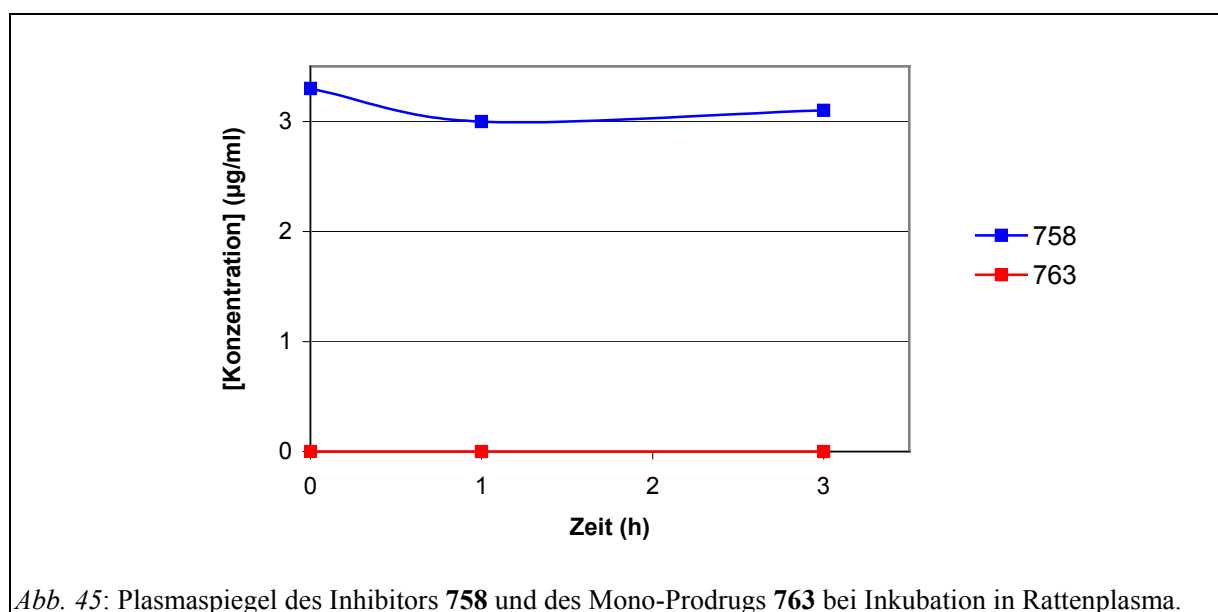
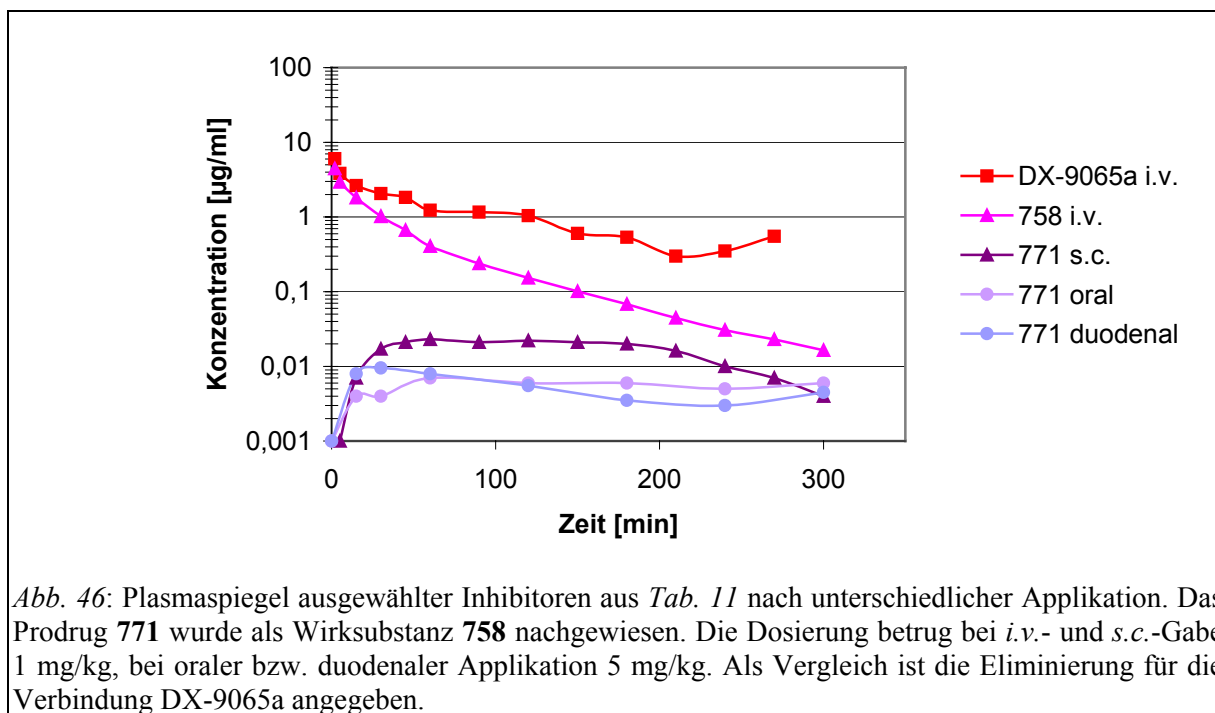


Abb. 45: Plasmaspiegel des Inhibitors **758** und des Mono-Prodrugs **763** bei Inkubation in Rattenplasma.

Bei Versuchen an der Ratte wurde eine sehr geringe Resorption des Prodrugs **771** sowohl nach duodenaler als auch nach oraler Gabe beobachtet (Abb. 46).



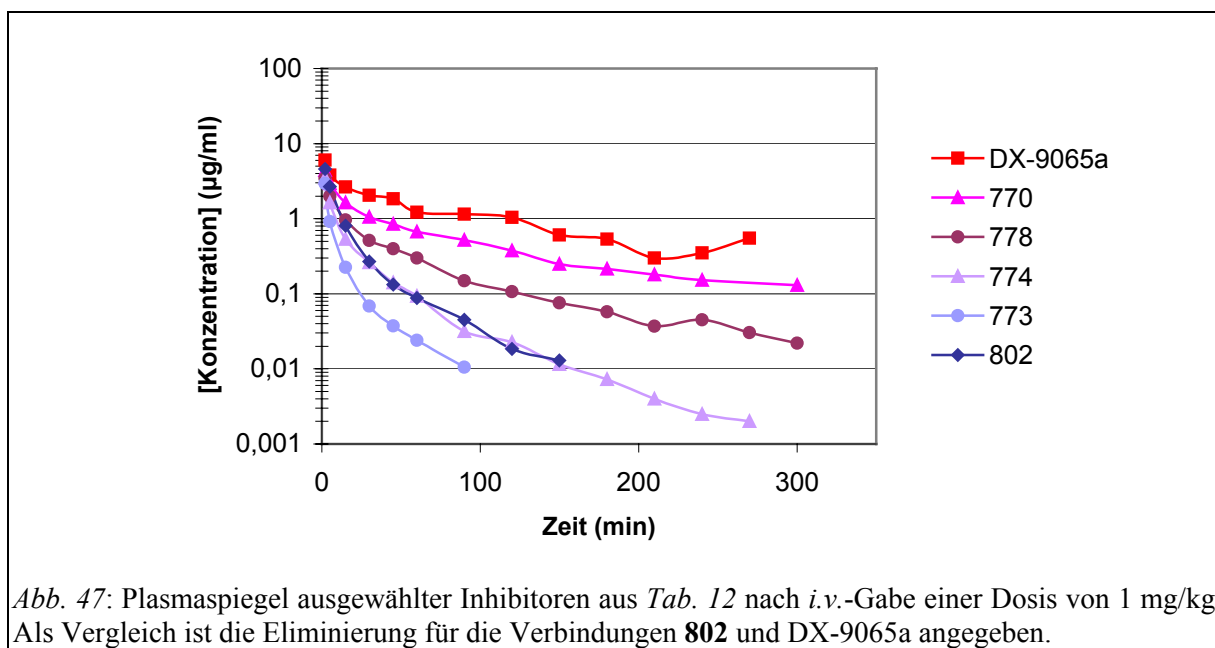
Es konnten jedoch in keiner Phase des Resorptionsversuches ausreichende Plasmaspiegel (ca. 0,2 µg/ml; vgl. Kapitel 3.4.3.) erreicht werden. Aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit wurde die Verbindung 771 nicht weiterentwickelt.

Im Rahmen von weiteren Variationen mit D-hTyr wurde der P4-Rest mit Nitro- oder Aminogruppen modifiziert (Tab. 12).

Tab. 12 - Hemmkonstanten der Inhibitoren mit D-hTyr in P3-Position und substituierten P4-Resten.

Nr.	Chemical Structure		K _i (µM)				
	R	P2	FXa	Thrombin	Plasmin	uPA	Trypsin
	773	4-NO ₂	Gly	0,0052	0,88	0,85	0,5
774	4-NH ₂	Gly	0,003	0,56	0,52	0,33	0,0029
778	4-NO ₂	Glu	0,0068	15	0,36	3,4	0,0038
770	4-NH ₂	Glu	0,0019	78	0,13	3,1	0,0016

Alle Derivate zeigen mit K_i -Werten $\leq 6,8$ nM eine starke Hemmwirkung gegenüber FXa. Allerdings wird Verbindung **774** ähnlich schnell eliminiert wie die Verbindung mit unsubstituiertem P4-Rest (**745**, Tab. 10 und Abb. 44), während Inhibitor **773** sogar noch rascher ausgeschieden wird. In Kombination mit P2-Glu (**778** und **770**) konnte eine Verzögerung der Eliminationsgeschwindigkeit beobachtet werden (Abb. 47).



Da sich aber in dem mit Verbindung **760** durchgeführten Ames-Test gezeigt hatte, dass eine anilinische Aminogruppe am Benzylsulfonylrest möglicherweise mutagene Effekte hat, wurde der Inhibitor **770** trotz seiner deutlich verzögerten Elimination nicht weiter untersucht.

2.2.5. Inhibitoren mit D,L-Homopyridylalaninen

Der Einbau des 4-Homopyridylalanins als P3-Aminosäure führte zu einem stark wirksamen und selektiven Inhibitor (**740**, $K_i = 7,1$ nM). Nachdem auch das 3- und das 2-Homopyridylalanin in der Arbeitsgruppe hergestellt worden war, wurden die Verbindungen **1705** und **1707** synthetisiert, die ähnliche Hemmwirkungen auf FXa besitzen.

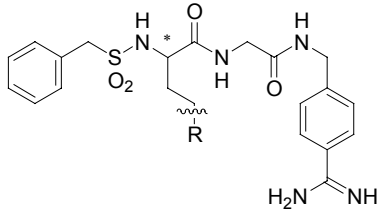
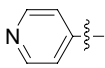
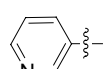
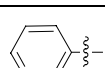
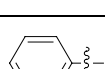
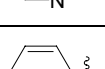
Aus vorangegangenen Synthesen ist bekannt, dass der Einbau von D-Aminosäuren in P3-Position zu wirksamen FXa-Inhibitoren führt, während Substanzen mit Aminosäuren in L-Konfiguration deutlich weniger wirksam sind (Tab. 1). Aus diesem Grund wurde eine Racemattrennung der Homopyridylalanin-Derivate durchgeführt und anschließend die reinen⁷ D-Derivate **1734** und **1730** der racemischen Inhibitoren **1705** und **1707** synthetisiert (Tab. 13).

⁷ Laut Reaktion mit Marfey's Reagenz zu ca. 5 % mit L-Verbindung verunreinigt (vgl. Kapitel 5.6.6.).

2. Ergebnisse

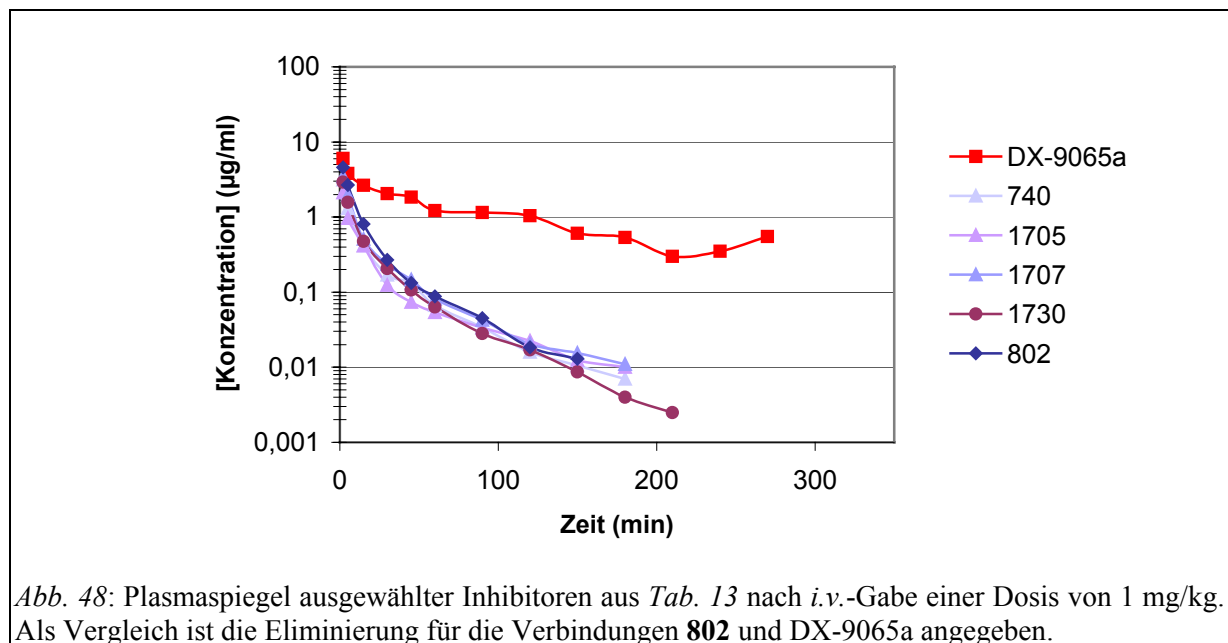
Dabei erwies sich Verbindung **1730** mit einem K_i -Wert von 0,71 nM als ein sehr wirksamer und selektiver FXa-Hemmstoff.

Tab. 13 - Hemmkonstanten der Inhibitoren mit *hAla(Pyr)* in P3-Position.

Nr.							
	*	R	K_i (μM)				
			FXa	Thrombin	Plasmin	uPA	Trypsin
740	D,L		0,0071	2,0	1,2	1,2	0,017
1705	D,L		0,004	2,0	1,5	3,2	0,028
1734	D		0,0019	1,2	0,68	0,71	0,014
1707	D,L		0,00083	2,0	2,8	4,3	0,018
1730	D		0,00071	1,9	1,1	1,7	0,0077

(* Konfiguration der P3-Aminosäure)

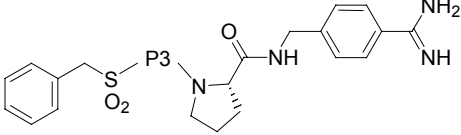
Trotz der exzellenten FXa-Hemmwirkung zeigt keines der in Tab. 13 zusammengefassten Derivate eine verzögerte Eliminierung aus der Zirkulation von Ratten (Abb. 48).



2. Ergebnisse

Es ist seit langem bekannt, dass Prolin eine besonders geeignete P2-Aminosäure in Substrat-analogen Thrombininhibitoren ist [Steinmetzer *et al.*, 2001; Steinmetzer u. Stürzebecher, 2004]. Auch FXa wird wirksam durch Inhibitoren mit P2-Pro gehemmt (*Tab. 1*). Da inzwischen mehrere andere Gruppen versuchen, duale Hemmstoffe von FXa und Thrombin zu entwickeln [Nar *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2003], wurden Inhibitoren mit Pro in P2-Position und D,L-hAla(Pyr) als P3-Rest synthetisiert. Die resultierenden Diastereomere konnten durch RP-HPLC getrennt werden (*Tab. 14*). Die Zuordnung der Konfiguration der P3-Aminosäure erfolgte über die Bestimmung der FXa-Hemmwirkung. Dabei wird angenommen, dass das D-Derivat der wirksamere Inhibitor ist.

Tab. 14 - Hemmkonstanten der Inhibitoren mit hAla(Pyr) in P3- und Pro in P2-Position.

Nr.						
	P3	K _i (μM)				
		FXa	Thrombin	Plasmin	uPA	Trypsin
1708	D-hAla(4-Pyr)	0,0021	0,0022	0,032	0,1	0,0019
1709	L-hAla(4-Pyr)	0,36	0,026	n.b.	2,8	n.b.
1733	D-hAla(3-Pyr)	0,0036	0,0032	0,023	0,17	n.b.
1732	L-hAla(3-Pyr)	0,22	0,023	1,5	2,9	0,047
1729	D-hAla(2-Pyr)	0,0024	0,005	0,05	0,3	0,0016
1728	L-hAla(2-Pyr)	0,48	0,013	5,6	4,4	0,034

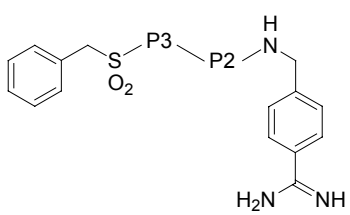
(n.b. = nicht bestimmt)

Die Inhibitoren **1708**, **1733** und **1729** mit D-hAla(Pyr) sind bei den meisten untersuchten Proteasen ähnlich wirksam und können als duale Thrombin- und FXa-Hemmstoffe angesehen werden. Die korrespondierenden L-Derivate **1709**, **1732** und **1728** hemmen Thrombin mit K_i-Werten um 20 nM. Aufgrund der relativ starken Plasminhemmung (K_i Plasmin ≤ 50 nM) sind diese Verbindungen jedoch für eine Weiterentwicklung als FXa- und/oder Thrombin-hemmstoffe ungeeignet.

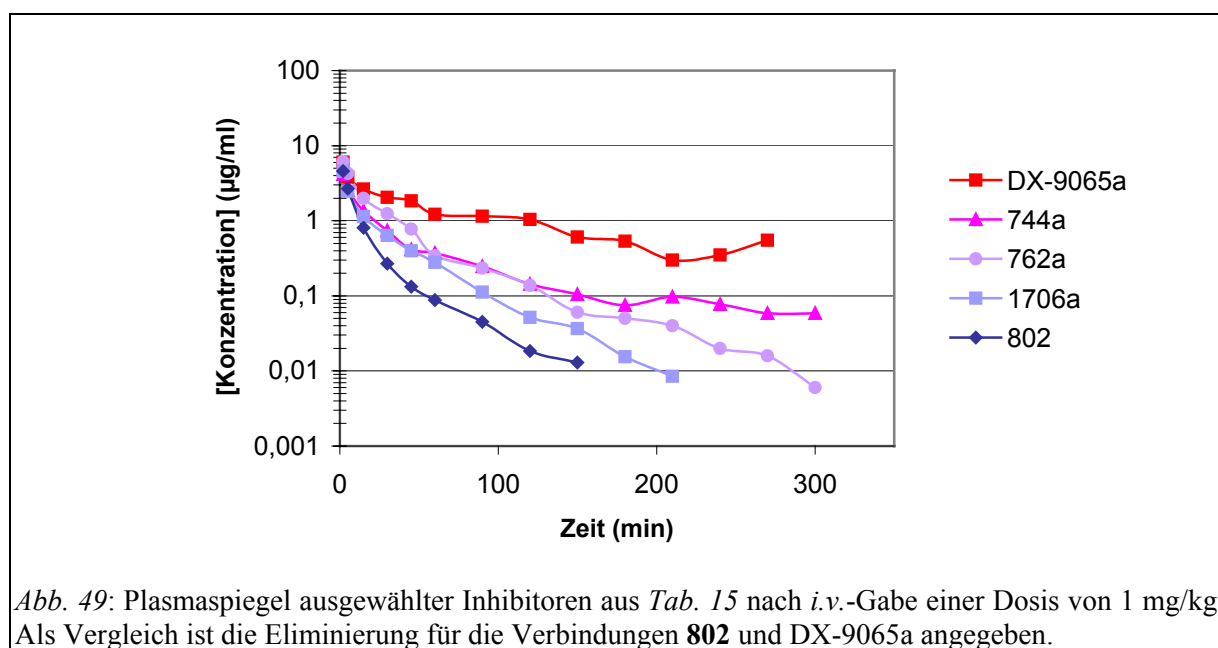
Die Kombination von P3-D,L-hAla(Pyr) mit anderen P2-Aminosäuren wie Ser oder Glu führte ebenfalls zu wirksamen FXa-Inhibitoren. Auch hier konnten die Diastereomere durch RP-HPLC getrennt werden (*Tab. 15*).

2. Ergebnisse

Tab. 15 - Hemmkonstanten der Inhibitoren mit hAla(Pyr) in P3-Position und polaren P2-Resten.

Nr.							
	P3	P2	K _i (μM)				
			FXa	Thrombin	Plasmin	uPA	Trypsin
744a	D-hAla(4-Pyr)	Ser	0,014	0,91	0,075	0,32	0,0027
744b	L-hAla(4-Pyr)	Ser	0,099	4,6	0,6	2,0	0,014
762a	D-hAla(4-Pyr)	Glu	0,0037	100	0,22	100	0,0028
762b	L-hAla(4-Pyr)	Glu	0,39	27	4,6	36	0,073
1706a	D-hAla(3-Pyr)	Glu	0,0027	32	0,16	6,2	0,0034
1706b	L-hAla(3-Pyr)	Glu	0,33	52	2,5	58	0,033

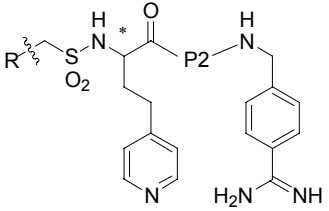
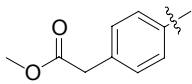
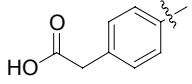
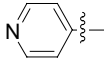
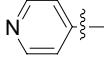
Vor allem die Inhibitoren mit P2-Glu (**762a** und **1706a**) zeigen eine wirksame FXa-Hemmung ($K_i \leq 3,7$ nM), jedoch sind sämtliche Verbindungen weniger selektiv gegenüber Plasmin. Auch in diesen Fällen bewirkte der Einbau einer polaren oder geladenen Aminosäure (wie Ser oder Glu) in P2-Position eine verzögerte Eliminationsgeschwindigkeit (Abb. 49).



2. Ergebnisse

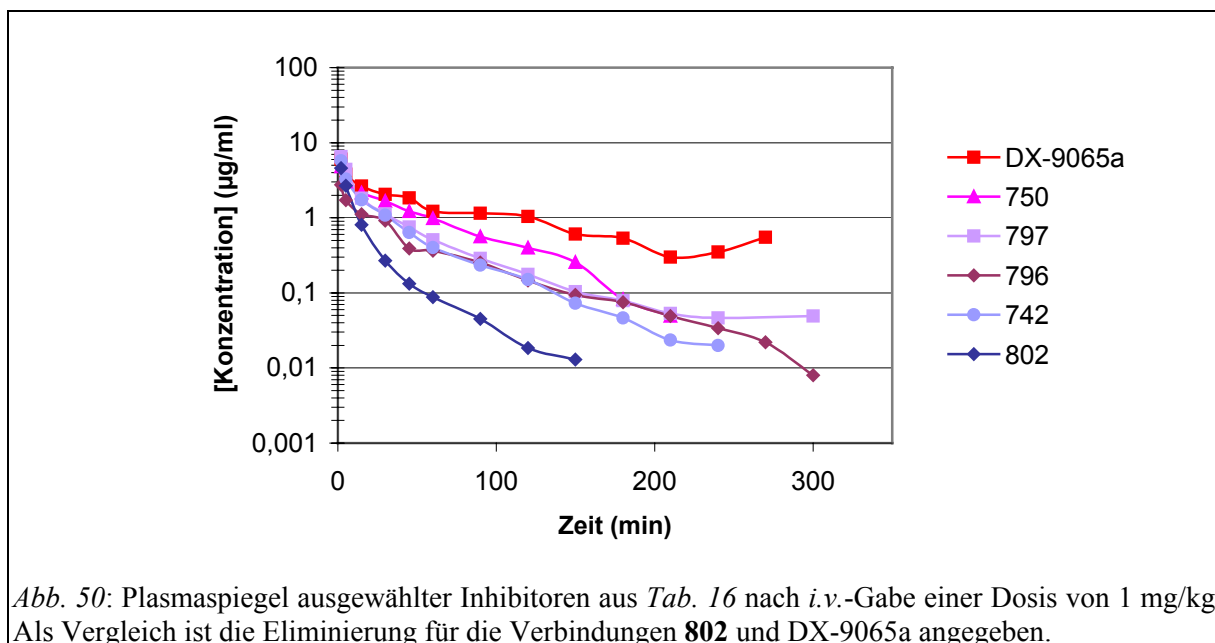
Parallel dazu wurde auch in der Reihe der Homopyridylalanin-Derivate versucht, das Eliminationsverhalten durch Substitutionen am P4-Rest zu beeinflussen. Da zu Beginn der synthetischen Arbeit nur das D,L-hAla(4-Pyr) zur Verfügung stand, wurden sämtliche Derivate mit dieser Aminosäure hergestellt (Tab. 16).

Tab. 16 - Hemmkonstanten der Inhibitoren mit D,L-hAla(4-Pyr) in P3-Position in Kombination mit verschiedenen P4- und P2-Resten.

Nr.							
	R	P2	K _i (μM)				
			FXa	Thrombin	Plasmin	uPA	Trypsin
796		Gly	0,017	3,8	1,8	1,6	0,011
797		Gly	0,012	36	2,7	5,1	0,024
742		Gly	0,022	3,2	4,4	2,0	0,034
750		Ser	0,084	5,6	0,21	0,6	0,007

(* racemisch)

Der Einbau der Carboxymethylfunktion (797) und des Pyridylrestes (742) in P4 bewirkte in Verbindung mit Gly als P2-Aminosäure nur einen leichten Verlust der Wirksamkeit (K_i-Werte ≤ 22 nM). In Kombination mit P2-Ser kam es durch Einbau des Pyridylrestes zu einem deutlichen Aktivitätsverlust (750, K_i = 84 nM) und wie erwartet zu einer Abnahme der Selektivität gegenüber Plasmin. Allerdings werden sämtliche Derivate dieser Serie langsamer eliminiert (Abb. 50).



Da zum Zeitpunkt der Synthese der in Tab. 17 aufgeführten Hemmstoffe die Ergebnisse aus dem Ames-Test mit Verbindung **760** noch nicht bekannt waren, wurden Inhibitoren mit Nitro- (**786**, **782a** und **782b**) und Aminogruppen (**787**, **783a** und **783b**) am P4-Ring hergestellt. Die durch Kombination mit P2-Glu entstandenen Diastereomere wurden mittels RP-HPLC getrennt.

Tab. 17 - Hemmkonstanten der Inhibitoren mit hAla(4-Pyr) in P3-Position und verschiedenen P4- und P2-Resten.

Nr.								
	R	*	P2	K _i (µM)				
				FXa	Thrombin	Plasmin	uPA	Trypsin
786	4-NO ₂	D,L	Gly	0,0067	1,9	2,6	0,69	0,021
787	4-NH ₂	D,L	Gly	0,0049	1,0	1,5	0,51	0,011
782a	4-NO ₂	D	Glu	0,0041	35	0,28	1,4	0,0052
782b	4-NO ₂	L	Glu	0,82	400	29	84	0,082
783a	4-NH ₂	D	Glu	0,0031	25	0,31	1,5	0,0039
783b	4-NH ₂	L	Glu	0,045	84	2,2	17	0,02

(* Konfiguration der P3-Aminosäure)

2. Ergebnisse

Die Verbindungen **786** und **787** mit Gly als P2-Aminosäure besitzen mit 6,7 und 4,9 nM sehr wirksame Hemmkonstanten für FXa und eine hohe Selektivität gegenüber den meisten anderen untersuchten Enzymen. Bei den P2-Glu-Derivaten **782a** und **783a** ($K_i = 4,1$ bzw. 3,1 nM) wurde wieder eine verringerte Selektivität gegenüber Plasmin beobachtet. Unter allen in *Tab. 17* aufgeführten Substanzen wird der Inhibitor **783a** am langsamsten eliminiert und hat ein mit DX-9065a vergleichbares Eliminationsprofil (*Abb. 51*).

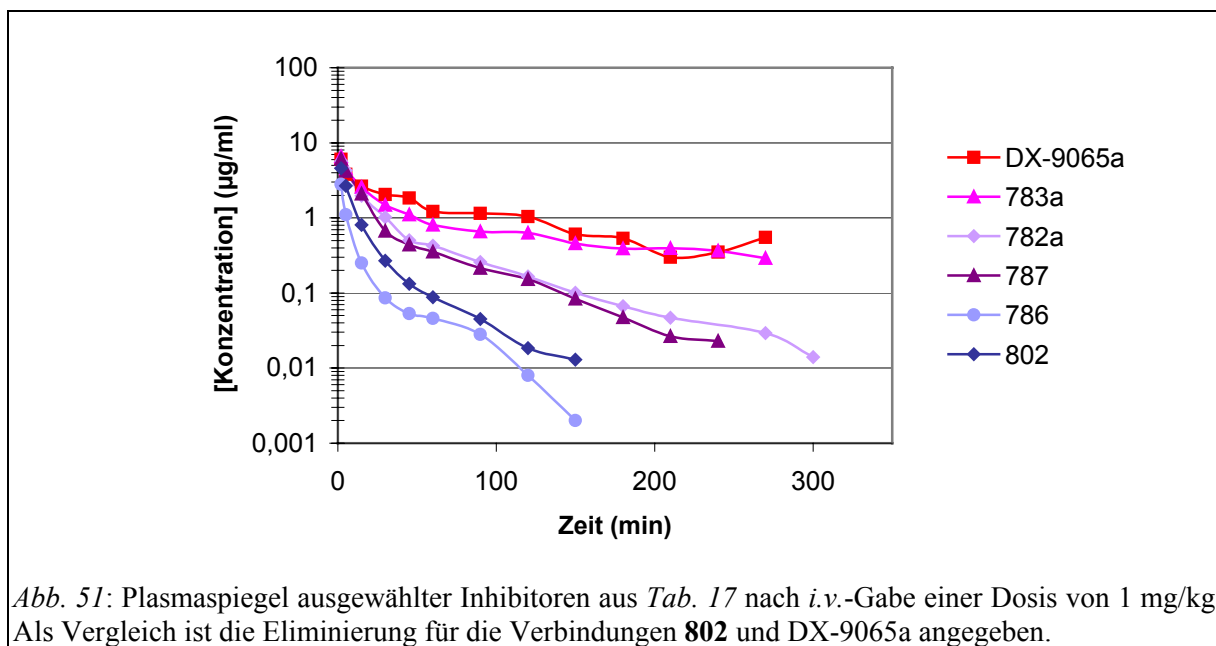


Abb. 51: Plasmaspiegel ausgewählter Inhibitoren aus *Tab. 17* nach *i.v.*-Gabe einer Dosis von 1 mg/kg. Als Vergleich ist die Eliminierung für die Verbindungen **802** und DX-9065a angegeben.

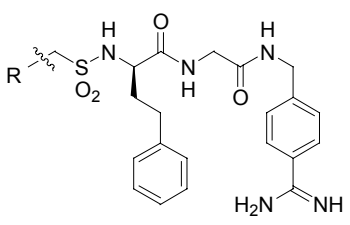

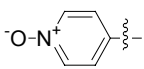
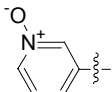
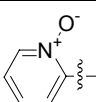
Diese Ergebnisse zeigen, dass der Einbau von 4-Homopyridylalanin als P3-Rest zu Inhibitoren mit starker Wirksamkeit und hoher Selektivität führt und in Kombination mit geeigneten P4- und P2-Resten das Eliminationsverhalten verbessert. Da eine Aminogruppe aufgrund der Ergebnisse des Ames-Tests als Substituent für eine weitere Entwicklung ausgeschlossen war und Ser sowie Glu in P2-Position die Selektivität gegenüber Plasmin im Vergleich zu Gly verringern, wurde nach alternativen Möglichkeiten zur Optimierung der Verbindungen gesucht. Anhand verschiedener Beispiele ist bekannt, dass durch Einbau von Pyridyl-N-Oxiden die pharmakokinetischen Eigenschaften von Inhibitoren verbessert werden können, ohne die Wirksamkeit der Verbindungen zu verringern [Burgey *et al.*, 2003; Marquis *et al.*, 2004].

Diese Strategie wurde auf die bereits beschriebenen Inhibitoren angewandt und deren Pyridyl-Stickstoffe wurden in N-Oxide überführt.

2.2.6. Inhibitoren mit Pyridyl-N-Oxiden in P4-Position

In einer ersten Serie wurden die Pyridyl-N-Oxide in P4-Position eingebaut. Analog zu den in *Tab. 9* zusammengefassten Pyridyl-Verbindungen (**741**, **748** und **749**) wurden die Inhibitoren **1307**, **1711** und **1217** synthetisiert (*Tab. 18*).

Tab. 18 - Hemmkonstanten der Inhibitoren mit D-hPhe in P3- und Pyridyl-N-Oxiden in P4-Position.

Nr.		K _i (μM)					
		R	FXa	Thrombin	Plasmin	uPA	Trypsin
802 (<i>Tab. 2</i>)		0,006	0,047	1,1	0,91	0,011	
1307^x		1,3	16	1,2	29	0,12	
1711		0,82	14	25	34	0,35	
1217^{xx}		0,49	11	28	> 1000	0,4	

(^x synthetisiert von Dr. Daniel Dönnecke; ^{xx} synthetisiert von Martin Korsonewski)

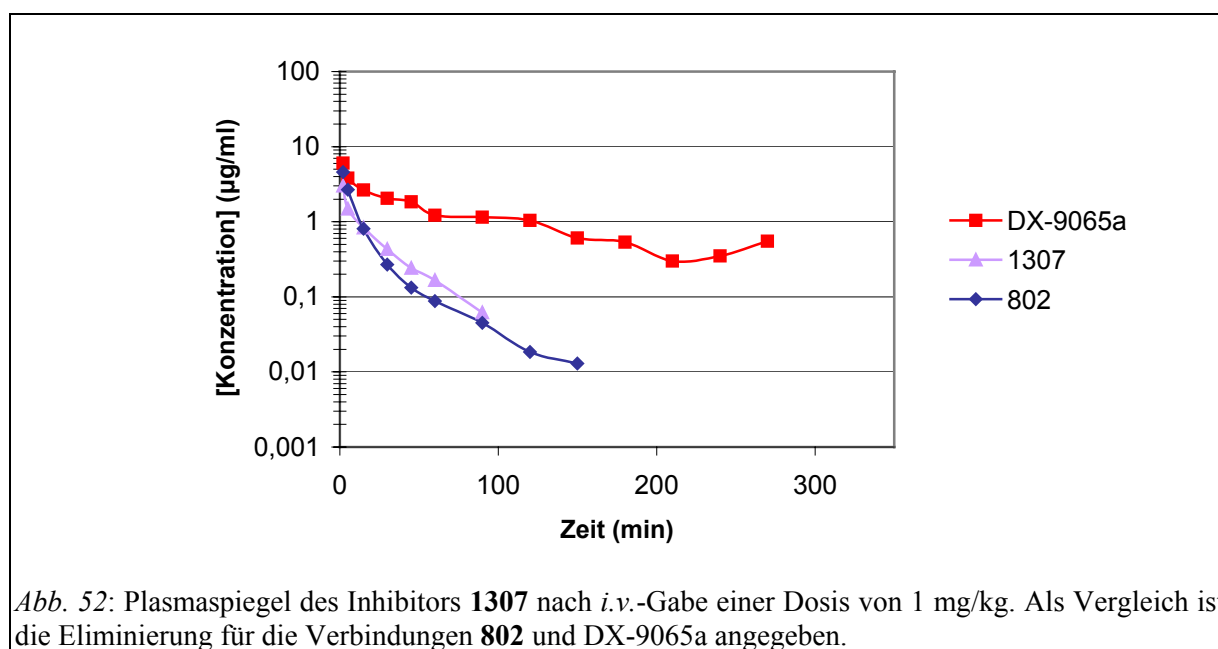


Abb. 52: Plasmaspiegel des Inhibitors 1307 nach i.v.-Gabe einer Dosis von 1 mg/kg. Als Vergleich ist die Eliminierung für die Verbindungen 802 und DX-9065a angegeben.

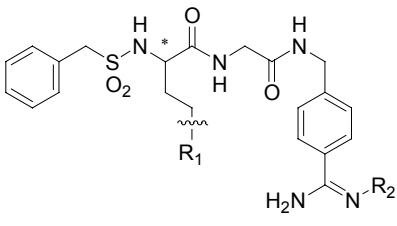
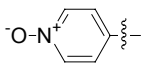
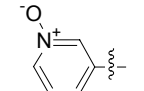
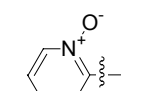
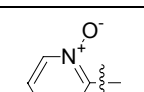
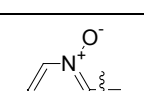
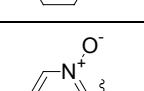
2. Ergebnisse

Alle Inhibitoren sind schwache FXa-Hemmstoffe (K_i -Werte $\geq 0,49 \mu\text{M}$), im Vergleich zur Ausgangsverbindung **802** wurde die Hemmwirkung etwa um den Faktor 100 reduziert. Aus diesem Grund wurden nur die Eliminierung des Inhibitors **1307** untersucht, die im Vergleich zu Verbindung **802** unverändert bleibt (Abb. 52). Wegen der geringen Wirksamkeit wurden keine weiteren Hemmstoffe mit diesen P4-Modifikationen synthetisiert.

2.2.7. Inhibitoren mit Pyridyl-N-Oxiden in P3-Position

Im Gegensatz zu den Verbindungen mit Pyridyl-N-Oxiden am P4-Rest wird deren Einbau in P3-Position ausgehend von den in Tab. 13 aufgeführten Homopyridylalanin-Verbindungen besser toleriert (Tab. 19).

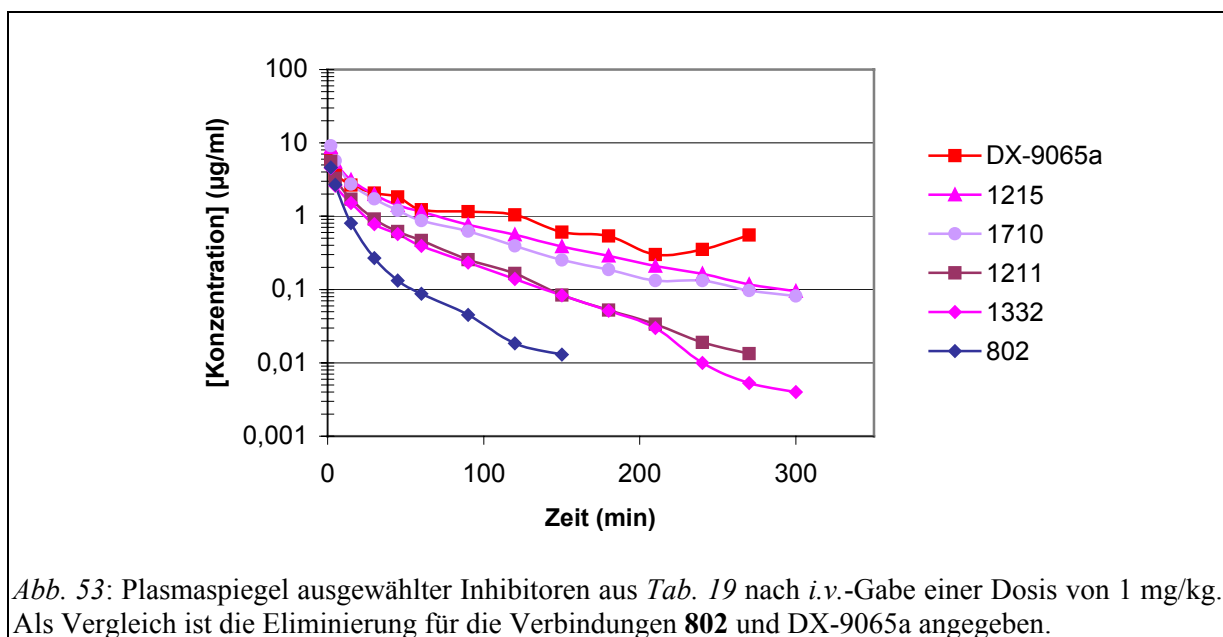
Tab. 19 - Hemmkonstanten der Inhibitoren mit hAla(Pyr-NO) in P3-Position

Nr.								
	*	R ₁	R ₂	K _i (μM)				
				FXa	Thrombin	Plasmin	uPA	Trypsin
1211^{xx}	D,L		H	0,015	4,1	3,1	3,4	0,0038
1710	D,L		H	0,019	3,2	2,7	3,0	0,04
1215^{xx}	D,L		H	0,00068	5,0	3,6	4,9	0,022
1332^x	D		H	0,00032	2,7	1,3	1,9	0,0063
1715	D,L		OH	0,26	> 1000	730	> 1000	27
1331^x	D		OH	0,86	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

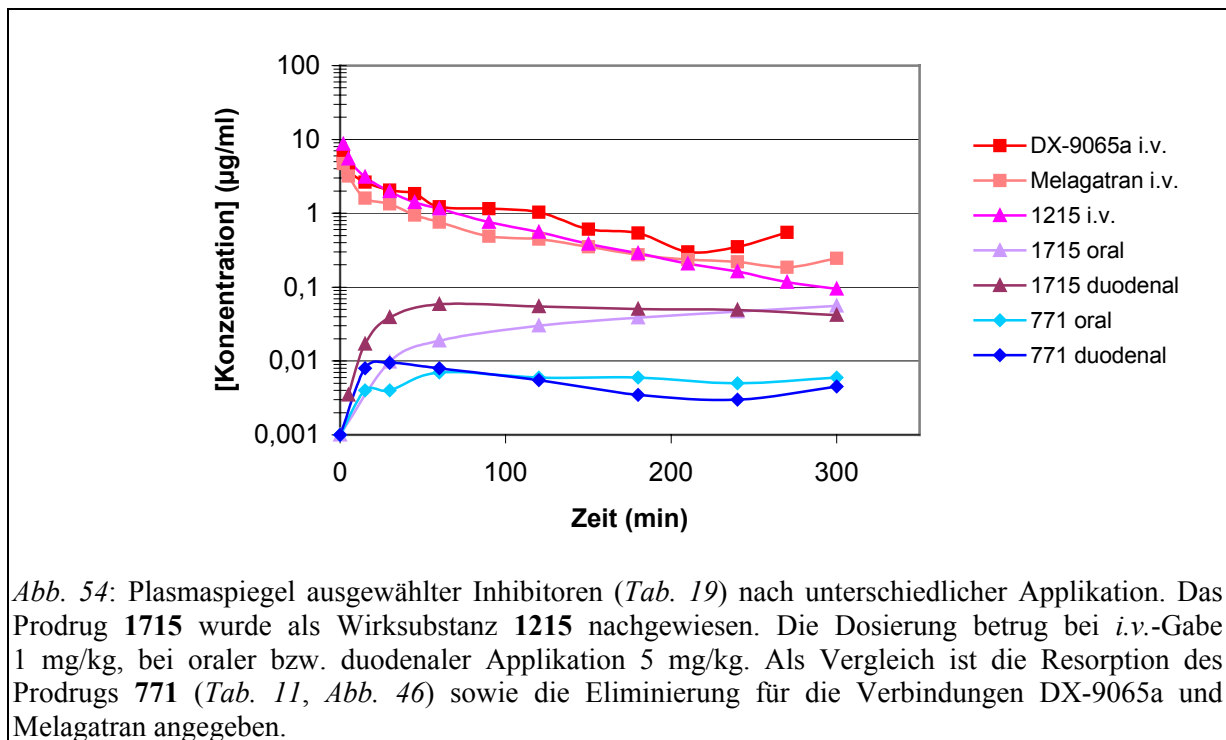
(* Konfiguration der P3-Aminosäure; n.b. = nicht bestimmt; ^x synthetisiert von Dr. Daniel Dönnecke; ^{xx} synthetisiert von Martin Korsonewski)

2. Ergebnisse

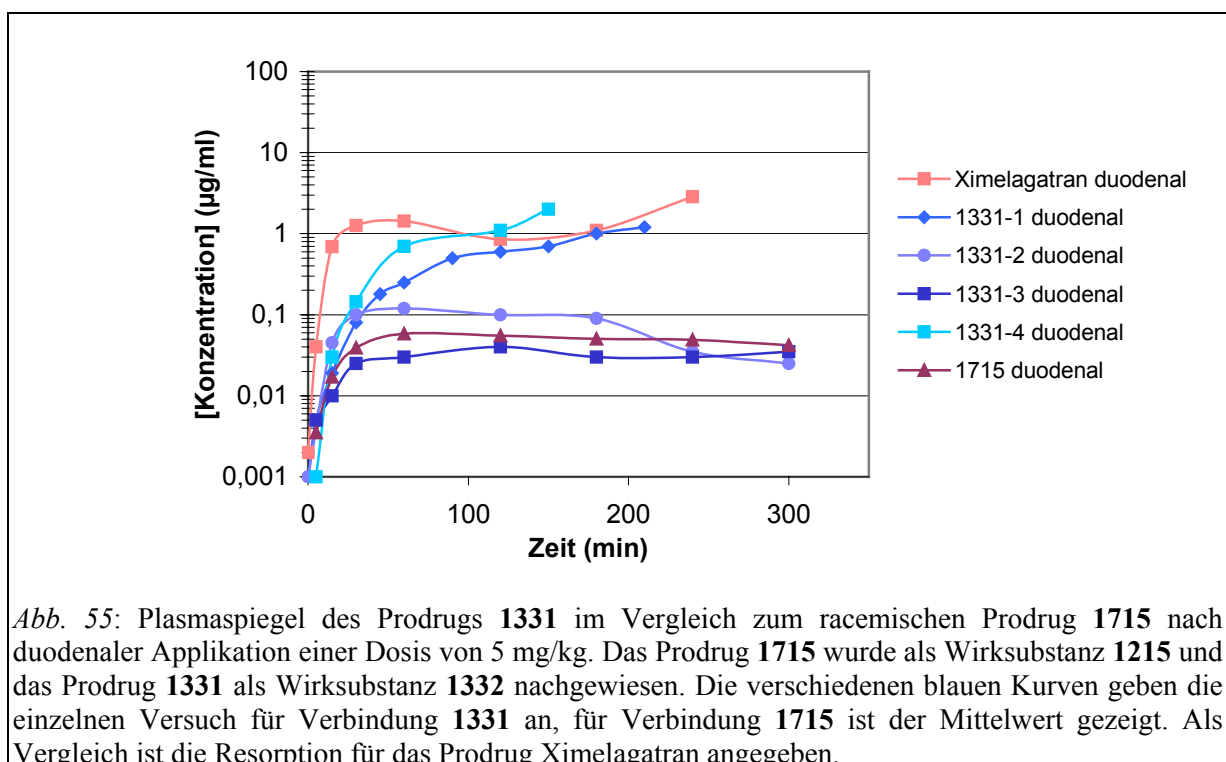
Die Inhibitoren **1211** und **1710** zeigen einen Verlust ihrer FXa-Affinität im Vergleich zu den analogen Pyridyl-Verbindungen. Dagegen wurde für Verbindung **1215** eine starke ($K_i = 0,68 \text{ nM}$) und sehr selektive FXa-Hemmung bestimmt. Die Hemmstoffe **1215** und **1710** besitzen eine deutlich verzögerte Eliminationsgeschwindigkeit (Abb. 53). Aufgrund ihrer starken FXa-Hemmwirkung, exzellenten Selektivität und verzögerten Eliminierung wurde die racemische Verbindung **1215** als reines D-Derivat synthetisiert (**1332**). Überraschenderweise wird der Inhibitor **1332** im Vergleich zur racemischen Verbindung **1215** schneller aus der Zirkulation von Ratten eliminiert (Abb. 53). Die Ursachen für diese raschere Eliminierung sind bisher nicht bekannt.



Um eine orale Aufnahme der Verbindung **1215** zu erreichen, wurde das Hydroxyamidino-Prodrug **1715** synthetisiert. In ersten Tests an der Ratte wurde für das Prodrug eine relativ geringe Resorption nach oraler und duodener Applikation bestimmt, die jedoch höher ist als die der D-hTyr-Verbindung **771** (Abb. 54). Zum Vergleich ist in die Eliminationskurve für den direkten Thrombinhemmer Melagatran angegeben (Abb. 4), der ein mit DX-9065a vergleichbares Eliminationsprofil besitzt.



Im Rahmen der stereoselektiven Synthese des Inhibitors **1332** wurde auch dessen Prodrug **1331** hergestellt. Nach oraler und duodenaler Applikation des Prodrugs **1331** an Ratten konnte eine leicht erhöhte Resorption im Vergleich zur racemischen Verbindung **1715** beobachtet werden (Abb. 55 und Abb. 56). Zusätzlich sind die Resorptionskurven für Ximelagatran, das Prodrug des Melagatrans wiedergegeben [Gustafsson *et al.*, 2001].



2. Ergebnisse

Die Kurven der einzelnen Versuche 1331-1 bis 1331-4 zeigen nach duodенaler Applikation eine sehr starke Streuung⁸: Eine Kurve liegt unter der des Prodrugs **1715**, während andere eine ähnlich hohe bzw. deutlich höhere Resorption zeigen (*Abb. 55*). Nach oraler Applikation ist die Resorption etwas geringer als bei duodенaler Gabe des Inhibitors. Obwohl nur zwei Einzelversuche durchgeführt wurden (1331-1 und 1331-2), ist auch in diesem Fall die Streuung deutlich zu erkennen (*Abb. 56*).

Im Vergleich zu Ximelagatran zeigt sich in beiden Versuchen eine geringere Resorption (*Abb. 55 und Abb. 56*).

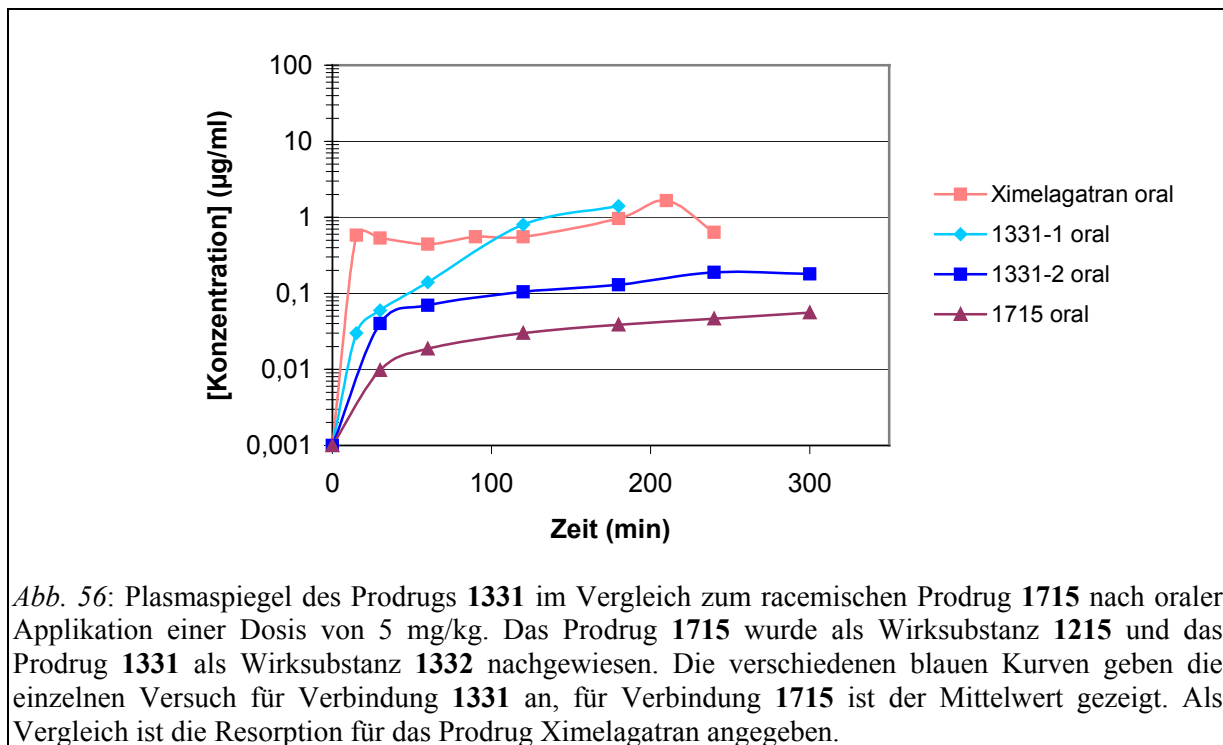


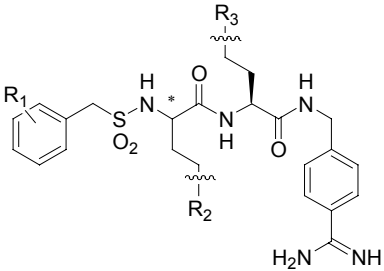
Abb. 56: Plasmaspiegel des Prodrugs **1331** im Vergleich zum racemischen Prodrug **1715** nach oraler Applikation einer Dosis von 5 mg/kg. Das Prodrug **1715** wurde als Wirksubstanz **1215** und das Prodrug **1331** als Wirksubstanz **1332** nachgewiesen. Die verschiedenen blauen Kurven geben die einzelnen Versuch für Verbindung **1331** an, für Verbindung **1715** ist der Mittelwert gezeigt. Als Vergleich ist die Resorption für das Prodrug Ximelagatran angegeben.

⁸ Bei Resorptionsversuchen mit dem Thrombinhemmstoff Melagatran wurden an der Ratte ähnlich starke Schwankungen beobachtet [Eriksson *et al.*, 2003].

2.2.8. Inhibitoren zur Hemmung der Blutgerinnung

Im Rahmen der Synthesen der oben genannten FXa-Hemmstoffe entstanden die in *Tab. 20* zusammengefassten Verbindungen **775**, **777**, **781a**, **781b**, **761a** und **761b** als Neben- oder Zwischenprodukte. Die Hemmstoffe dieser Serie besitzen in P2-Position einen substituierten Glu-Rest. Die Derivate **1703a**, **1703b**, **1704a** und **1704b** wurden zusätzlich synthetisiert und die Diastereomere mittels RP-HPLC getrennt.

Tab. 20 - Hemmkonstanten der Inhibitoren mit Glu-Derivaten in P2-Position.

Nr.						K _i (μM)				
	R ₁	*	R ₂	R ₃	FXa	Thrombin	Plasmin	uPA	Trypsin	
	775	3-NO ₂	D			0,26	2,3	0,18	2,0	0,034
777	4-NO ₂	D			0,013	0,69	0,027	0,5	0,0035	
781a	4-NO ₂	D			0,009	1,4	0,023	0,29	0,0016	
781b	4-NO ₂	L			0,72	8,9	2,9	21	0,06	
761a	H	D			0,0066	0,17	0,026	0,22	0,0046	
761b	H	L			2,9	1,2	2,2	6,6	0,053	
1703a	H	D			0,0057	1,7	0,027	0,33	0,0032	
1703b	H	L			1,9	3,7	3,0	21	0,13	
1704a	H	D			0,0036	5,2	0,008	0,77	0,0042	
1704b	H	D			1,4	2,5	1,0	30	0,092	

(* Konfiguration der P3-Aminosäure)

2. Ergebnisse

Alle Verbindungen sind sehr unspezifisch und hemmen neben FXa auch die meisten anderen untersuchten Proteasen. In Analogie zu den oben aufgeführten FXa-Inhibitoren zeigen auch in diesen Fällen die Verbindungen mit D-Aminosäuren in P3-Position die stärkere Hemmwirkung. Bei den Hemmstoffen dieser Gruppe war eine Bestimmung der Eliminationskinetik nicht notwendig, da eine systemische Anwendung der Substanzen nicht in Frage kommt.

Aufgrund ihres breiten Wirkspektrums sollten die Inhibitoren dieser Serie in Zusammenarbeit mit Prof. P. Hellstern, Ludwigshafen, zur Antikoagulation von Blutkonserven anstelle von Hirudin oder Citrat⁹ eingesetzt werden, um weiterführende Untersuchungen der zellulären Blutbestandteile (Plättchendiagnostik) zu ermöglichen. Dabei wurden auch die bereits in *Tab. 14* beschriebenen unselektiven FXa- und Thrombininhibitoren untersucht. Die Hemmkonstanten der Verbindungen für die wichtigsten an der Blutgerinnung beteiligten Proteasen sind in *Tab. 21* zusammengefasst.

Tab. 21 - Weitere Hemmkonstanten ausgewählter Gerinnungshemmstoffe aus Tab. 14 und Tab. 20.

Nr.	K _i (μM)				
	FXa	Thrombin	PK	FXIIa	FXIa
777	0,013	0,69	0,054	0,28	0,031
781a	0,009	1,4	0,017	0,38	0,028
761a	0,0066	0,17	0,0055	0,094	0,031
1703a	0,0057	1,7	0,0083	0,059	0,04
1704a	0,0036	5,2	0,01	0,098	0,19
1708	0,0021	0,0022	0,0023	0,14	0,019
1733	0,0036	0,0032	0,012	0,1	0,018
1729	0,0024	0,005	0,013	0,073	0,029

Die gelben Felder markieren Hemmkonstanten < 60 nM.

Die meisten Gerinnungshemmstoffe hemmen Plasmakallikrein (PK) und FXIa mit K_i-Werten < 60 nM, während lediglich Verbindung **1703a** eine Inhibierung von FXIIa zeigt. Die stärkste Hemmung der in *Tab. 21* gezeigten Enzyme wurde für den Inhibitor **1708** beobachtet.

Zusätzlich wurde die gerinnungshemmende Wirksamkeit dieser Verbindungen anhand der Hemmung der Thrombinbildung untersucht. Der Effekt der Substanzen **1703a** und **1708** auf die Prothrombinspaltung durch FXa ist im Kapitel **2.3.2.** gezeigt (*Abb. 57 und Abb. 58*).

⁹ Die Behandlung von Blutkonserven mit Citrat beeinträchtigt die Plättchenfunktion und erschwert so die Plättchendiagnostik [Harrison, 2004].

2.3. Genauere Charakterisierung ausgewählter Hemmstoffe

Zur genaueren Charakterisierung besonders wirksamer Inhibitoren wurden die K_i -Werte der Substanzen für weitere Trypsin-artige Serinproteasen bestimmt (Tab. 22).

Tab. 22 - Hemmkonstanten ausgewählter Proteaseinhibitoren.
Zum Vergleich sind die Werte für DX-9065a und Melagatran angegeben.

Nr.	K_i (μM)												
	FXa	Thrombin	Plasmin	uPA	Trypsin	PK	FXIIa	FXIa	FVIIa	Protein Ca	tPA	Matriptase	Tryptase
802 (Tab. 2)	0,006	0,047	1,1	0,91	0,011	0,39	0,15	0,27	12	0,63	0,532	0,2	1,4
745 (Tab. 10)	0,003	1,5	0,78	0,93	0,0039	0,15	0,12	0,61	6,2	0,41	0,18	0,069	0,79
1707* (Tab. 13)	0,00083	2,0	2,8	4,3	0,018	0,43	0,1	1,4	27	1,5	1,04	0,23	7,4
1730 (Tab. 13)	0,00071	1,9	1,1	1,7	0,0077	0,23	0,062	0,88	15	0,87	0,37	0,11	1,6
1215* (Tab. 19)	0,00068	5,0	3,6	4,9	0,022	0,69	0,11	5,7	19	1,7	0,95	0,15	14
1332 (Tab. 19)	0,00032	2,7	1,3	1,9	0,0063	0,37	0,14	1,7	19	0,84	0,51	0,11	6,2
770 (Tab. 12)	0,0019	78	0,13	3,1	0,0016	0,08	0,39	0,12	5,1	0,059	0,94	4,8	0,71
783a (Tab. 17)	0,0031	25	0,31	1,5	0,0039	0,047	1,2	0,027	6,9	0,14	6,6	7,2	3,9
758 (Tab. 10)	0,0031	19	0,15	3,6	0,026	0,22	0,36	0,028	7,5	0,053	0,58	3,2	0,86
762a (Tab. 15)	0,0037	100	0,22	100	0,0028	0,3	1,5	0,82	12	0,078	5,1	8,5	3,9
DX-9065a	0,007	70	13	33	15	0,53	0,34	2,3	92	4,4	15	0,16	20
Melagatran	4,9	0,0036	1,4	7,9	0,01	0,69	10,4	19	4,8	3,9	13	1,5	55

Die gelben Felder markieren Hemmkonstanten $< 0,1 \mu\text{M}$. (* racemisch)

Aus den in Tab. 22 gezeigten Werten wird deutlich, dass die FXa-Inhibitoren sehr selektiv sind und die anderen untersuchten Proteasen, außer Trypsin, kaum hemmen. Besonders die Inhibitoren **1707**, **1730**, **1215** und **1332** mit hAla(2-Pyr) oder hAla(2-Pyr-NO) in P3-Position besitzen eine exzellente Selektivität für FXa gegenüber den fibrinolytischen Enzymen und den meisten Gerinnungsfaktoren. Lediglich die Verbindungen **770**, **783a**, **758** und **762a** mit Glu in P2-Position zeigen mit K_i -Werten um $0,2 \mu\text{M}$ eine moderate Plasminhemmung und sind auch gegenüber PK, FXIa und Protein Ca zum Teil weniger selektiv; Inhibitor **745** hemmt außerdem Matriptase.

2.3.1. Bestimmung der Hemmwirkung auf den Prothrombinasekomplex

Unter physiologischen Bedingungen ist FXa Bestandteil des Prothrombinasekomplexes zusammen mit Faktor Va und Calcium-Ionen auf einer Phospholipidoberfläche. Daher ist es für die Charakterisierung eines FXa-Inhibitors wichtig, zu untersuchen, ob dieser auch FXa im Prothrombinasekomplex hemmt. Die Wirksamkeit der in Tab. 22 beschriebenen Hemmstoffe wurde daher in einem speziellen Test bestimmt (Tab. 23).

Tab. 23 - Hemmkonstanten ausgewählter Proteaseinhibitoren.
Zum Vergleich sind die Werte für DX-9065a angegeben.

Nr.	FXa K _i (μM)	FXa im Prothrombinasekomplex IC ₅₀ (μM)
802 (Tab. 2)	0,006	0,012
745 (Tab. 10)	0,003	0,013
1707* (Tab. 13)	0,00083	0,005
1730 (Tab. 13)	0,00071	0,004
1215* (Tab. 19)	0,00068	0,006
1332 (Tab. 19)	0,00032	0,005
770 (Tab. 12)	0,0019	0,01
783a (Tab. 17)	0,0031	0,011
758 (Tab. 10)	0,0031	0,006
762a (Tab. 15)	0,0037	0,035
DX-9065a	0,007	0,29

(* racemisch)

Die IC₅₀-Werte¹⁰ der untersuchten Inhibitoren sind alle ≤ 35 nM und korrelieren sehr gut mit den bekannten K_i-Werten für FXa. Im Vergleich zur Verbindung DX-9065a sind die Substanzen mindestens ca. 10-fach wirksamere Hemmstoffe des Prothrombinasekomplexes.

2.3.2. Bestimmung der Hemmwirkung auf die Thrombinbildung

Die Bestimmung zur Hemmung der Thrombinbildung beruht auf dem Nachweis der Prothrombinfragmente F1 und F2, welche bei der Thrombinbildung durch FXa von Prothrombin abgespalten werden [Pelzer *et al.*, 1991]. Die Konzentration dieser Fragmente beträgt im nicht-aktivierten Plasma $\leq 1,0$ nM, bei vollständiger Aktivierung steigt ihre Konzentration auf das ca. 1000-fache (d.h. $> 1,0$ μM) an. Anhand der Konzentration der

¹⁰ Der IC₅₀-Wert gibt die Inhibitorkonzentration an, die eine 50 %ige Hemmung bewirkt.

2. Ergebnisse

freigesetzten Fragmente F1 und F2 kann man auf die Effektivität einer FXa-Hemmung schließen. Eine direkte Thrombinhemmung zeigt in diesem Fall keinen Effekt, da für den Test Hirudinplasma verwendet wird (vgl. Kapitel 5.3.).

Der Gerinnungshemmstoff **1703a** (Tab. 20) ist bei einer Konzentration von 1,0 μM ein wirksamer Inhibitor der Thrombinbildung, bei geringeren Konzentrationen konnte jedoch nur eine ca. 50 %ige Hemmung erreicht werden (Abb. 57).

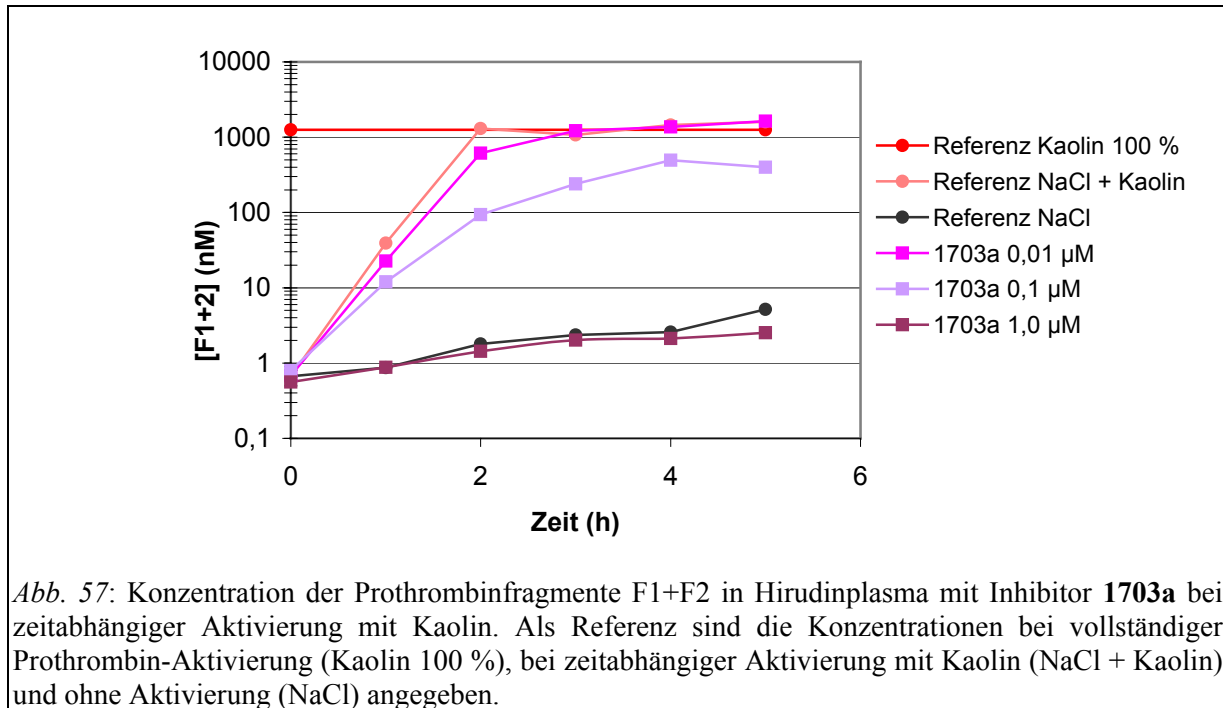


Abb. 57: Konzentration der Prothrombinfragmente F1+F2 in Hirudinplasma mit Inhibitor **1703a** bei zeitabhängiger Aktivierung mit Kaolin. Als Referenz sind die Konzentrationen bei vollständiger Prothrombin-Aktivierung (Kaolin 100 %), bei zeitabhängiger Aktivierung mit Kaolin (NaCl + Kaolin) und ohne Aktivierung (NaCl) angegeben.

Am Beispiel des unselektiven FXa- und Thrombinhemmstoffes **1708** (Tab. 14) wird deutlich, dass dieser schon in sehr geringen Konzentrationen von 0,1 μM die Thrombinbildung fast vollständig hemmt. Die in diesem Fall nach 5 h erreichte F1+F2-Endkonzentration von ≤ 10 nM entspricht ca. 1 % der maximal erreichbaren Konzentration. Bei einer Inhibitor-konzentration von 1,0 μM ist die F1+F2-Konzentration trotz Aktivierung mit Kaolin geringer als im nicht-aktivierten Plasma (Abb. 58).

2. Ergebnisse

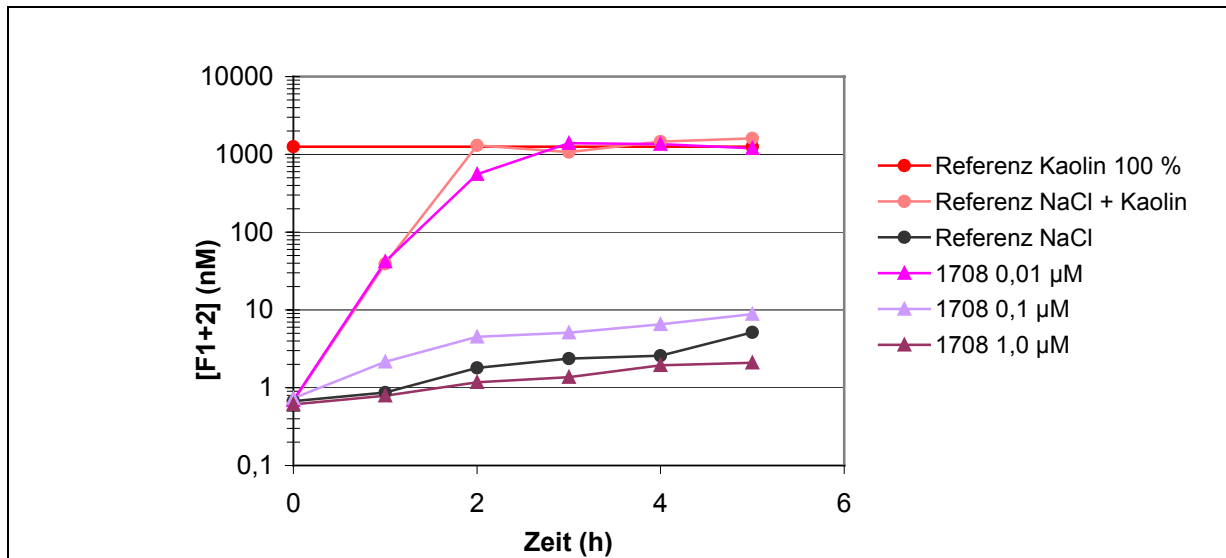


Abb. 58: Konzentration der Prothrombinfragmente F1+F2 in Hirudinplasma mit Inhibitor **1708** bei zeitabhängiger Aktivierung mit Kaolin. Als Referenz sind die Konzentrationen bei vollständiger Prothrombin-Aktivierung (Kaolin 100 %), bei zeitabhängiger Aktivierung mit Kaolin (NaCl + Kaolin) und ohne Aktivierung (NaCl) angegeben.

Eine vergleichbare Wirksamkeit auf die Thrombinbildung wurde für den selektiven FXa-Hemmstoff **1332** (Tab. 19) beobachtet. Hier ist der Effekt auf die Bildung der Fragmente F1 und F2 noch deutlicher zu erkennen: Schon bei Inhibitorkonzentrationen ab 0,1 µM liegt die F1+F2-Konzentrationskurve niedriger als die Referenzkurve für nicht-aktiviertes Plasma. Dieses Ergebnis bestätigt die aus dem K_i -Wert abgeleitete exzellente Hemmaktivität des Inhibitors **1332** für FXa.

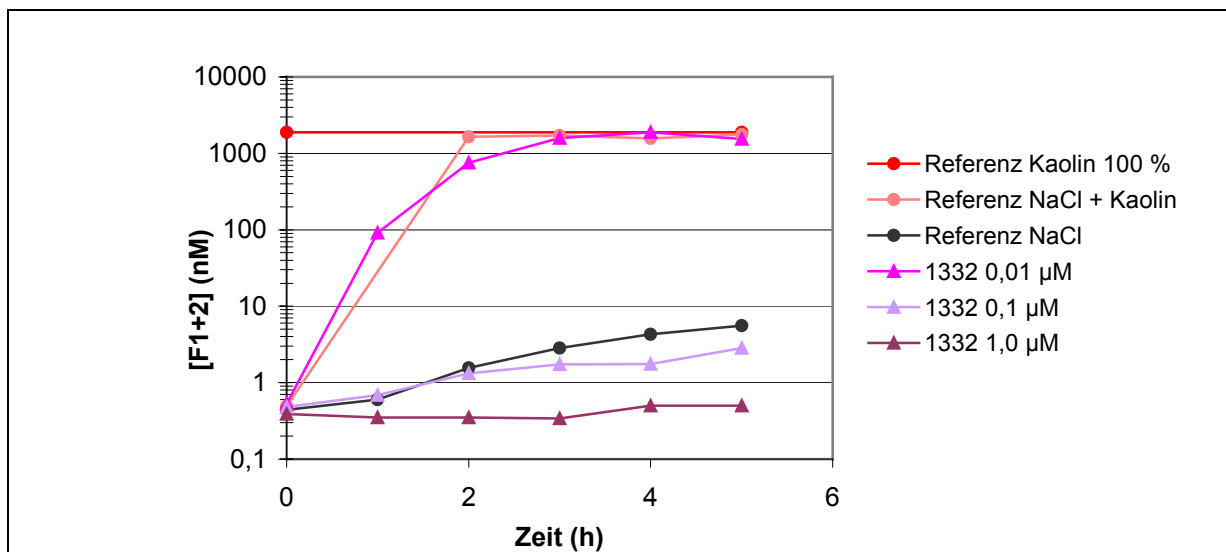


Abb. 59: Konzentration der Prothrombinfragmente F1+F2 in Hirudinplasma mit Inhibitor **1332** bei zeitabhängiger Aktivierung mit Kaolin. Als Referenz sind die Konzentrationen bei vollständiger Prothrombin-Aktivierung (Kaolin 100 %), bei zeitabhängiger Aktivierung mit Kaolin (NaCl + Kaolin) und ohne Aktivierung (NaCl) angegeben.

2.3.3. Bestimmung der gerinnungshemmenden Wirksamkeit *in vitro*

Zur Charakterisierung der Wirksamkeit wurde der Einfluss der synthetisierten Inhibitoren auf die Gerinnungshemmung in humanem Plasma *in vitro* (aktivierte Thromboplastinzeit (aPTT), Prothrombinzeit (PT), Thrombinzeit (TT)) untersucht [Kolde, 2001]. Diese Werte, die auch in der klinischen Routinediagnostik bestimmt werden, dienen im allgemeinen zur Feststellung der tatsächlichen antikoagulativen Wirksamkeit, welche in vielen Fällen mit den K_i -Werten für FXa korrespondiert. Die Thrombinzeit ist ein zusätzlicher Indikator für die Selektivität gegenüber Thrombin, denn ein selektiver FXa-Hemmstoff sollte die Thrombinzeit nicht beeinflussen. Bei der Entwicklung von FXa-Inhibitoren ist das Ziel, Verbindungen mit IC_{200} -Werten¹¹ $< 1,0 \mu\text{M}$ im PT- und aPTT-Test zu erhalten, die im TT-Assay kaum wirksam sind ($IC_{200 \text{ TT}} > 1,0 \mu\text{M}$).

Tab. 24 - IC_{200} -Werte ausgewählter Proteaseinhibitoren.
Zum Vergleich sind die Werte für DX-9065a und Melagatran angegeben.

Nr.	IC_{200} (μM)		
	TT	aPTT	PT
802 (Tab. 2)	2,2	0,38	0,45
745 (Tab. 10)	5,5	0,33	0,34
1707* (Tab. 13)	8,0	0,54	0,36
1730 (Tab. 13)	3,3	0,28	0,17
1215* (Tab. 19)	17	0,63	0,46
1332 (Tab. 19)	7,7	0,28	0,17
770 (Tab. 12)	> 100	0,45	0,63
783a (Tab. 17)	> 67	0,66	0,85
758 (Tab. 10)	> 100	0,65	0,95
762a (Tab. 15)	> 100	0,5	0,6
DX-9065a	> 10	1,05	0,52
Melagatran	0,015	0,24	0,37

Die gelben Felder markieren IC_{200} -Werte $< 0,6 \mu\text{M}$. (* racemisch)

¹¹ Der IC_{200} -Wert gibt die Konzentration an, die eine Verdopplung der Gerinnungszeit (200 %) bewirkt.

Die in *Tab. 24* zusammengefassten Inhibitoren sind mit aPTT- und PT-Werten von $< 1,0 \mu\text{M}$ wirksame Antikoagulantien *in vitro*. Im Vergleich zu DX-9065a besitzen alle Substanzen niedrigere IC_{200} -Werte für die aPTT, und auch im PT-Test sind mehrere Verbindungen wirksamer als DX-9065a. Im direkten Vergleich mit Melagatran sind die FXa-Hemmstoffe im aPTT-Test etwas weniger aktiv, viele zeigen jedoch eine ähnliche Wirksamkeit. Die IC_{200} -Werte für die PT sind mit den aPTT-Werten vergleichbar und einige Verbindungen, u.a. **1730** und **1332**, sind wirksamer als Melagatran.

Alle bestimmten IC_{200} -Werte für die Thrombinzeit sind $> 2,0 \mu\text{M}$, was die Selektivität der FXa-Hemmstoffe gegenüber Thrombin bestätigt. Dagegen zeigt der Thrombininhibitor Melagatran mit einem K_i -Wert von $3,6 \text{ nM}$ im TT-Assay eine starke Aktivität.

2.3.4. Bestimmung der antithrombotischen Wirksamkeit *in vivo*

Die wirksamsten Verbindungen wurden in einem Thrombosemodell nach Wessler untersucht [Wessler *et al.*, 1959]. In diesem Modell werden an der Ratte durch Gabe von Glaskontakt-aktiviertem Humanserum venöse Thrombosen ausgelöst. Durch gleichzeitige Injektion des Inhibitors soll die Thrombenbildung gehemmt werden. Die Wirksamkeit der einzelnen Verbindungen wurde nach Ende des Versuches anhand der Anzahl und Größe der entstandenen Gerinnsel bestimmt. Dabei entspricht ein Thrombus-Score von **0** einer vollständigen Hemmung der Thrombenbildung, d.h. einer starken antithrombotischen Wirksamkeit der untersuchten Substanz. Die Bewertungsskala reicht bis zu einem Score von **3**, der einen vollständigen Gefäßverschluss beschreibt - in diesem Fall wäre der Inhibitor wirkungslos. Demnach sind Verbindungen umso wirksamer, je geringer der bestimmte Thrombus-Score ist. Anhand des Thrombus-Score ist es möglich, den ED_{50} -Wert eines Inhibitors zu berechnen. Der ED_{50} -Wert beschreibt die effektive Dosis des Hemmstoffes, die benötigt wird, um den Thrombus-Score auf die Hälfte zu reduzieren. Um diesen zu ermitteln, wurden verschiedenen Dosierungen der Hemmstoffe auf ihre Wirksamkeit untersucht. Aus der Grafik in *Abb. 60* lässt sich der ED_{50} -Wert ablesen, der einen direkten Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Inhibitoren ermöglicht.

2. Ergebnisse

Tab. 25 - Thrombus-Score und ED₅₀-Werte ausgewählter Proteaseinhibitoren.
Zum Vergleich sind die Werte für DX-9065a und Melagatran angegeben.

Nr.	Thrombus-Score (Dosierung)				ED ₅₀ (mg/kg)
	1mg/kg	0,3mg/kg	0,1mg/kg	0,03 mg/kg	
802 (Tab. 2)	3	n.b.	n.b.	n.b.	> 1
745 (Tab. 10)	2	n.b.	n.b.	n.b.	> 1
1707* (Tab. 13)	1	2,5	3	n.b.	0,7
1730 (Tab. 13)	0	1	3	n.b.	0,27
1215* (Tab. 19)	0	2	n.b.	n.b.	0,4
1332 (Tab. 19)	0	0	1,25	2,75	0,095
770 (Tab. 12)	3	n.b.	n.b.	n.b.	> 1
783a (Tab. 17)	3	n.b.	n.b.	n.b.	> 1
758 (Tab. 10)	3	n.b.	n.b.	n.b.	> 1
762a (Tab. 15)	3	n.b.	n.b.	n.b.	> 1
DX-9065a	2,3	n.b.	n.b.	n.b.	> 1
Melagatran	0	0	2,3	3	0,13

Die gelben Felder markieren einen Thrombus-Score < 3. (* racemisch; n.b. = nicht bestimmt)

Mehrere Hemmstoffe sowie die Vergleichsverbindung DX-9065a zeigen mit ED₅₀-Werten > 1 mg/kg kaum Effekte in diesem Thrombosemodell nach Wessler. Im Gegensatz dazu weisen die Inhibitoren mit hAla(Pyr) und hAla(Pyr-NO) in P3-Position, insbesondere **1332**, selbst bei geringer Dosierung eine starke antithrombotische Wirksamkeit auf, die mit Melagatran vergleichbar ist (Tab. 25). Für diese Verbindungen ergeben sich aus Abb. 60 ED₅₀-Werte ≤ 0,7 mg/kg.

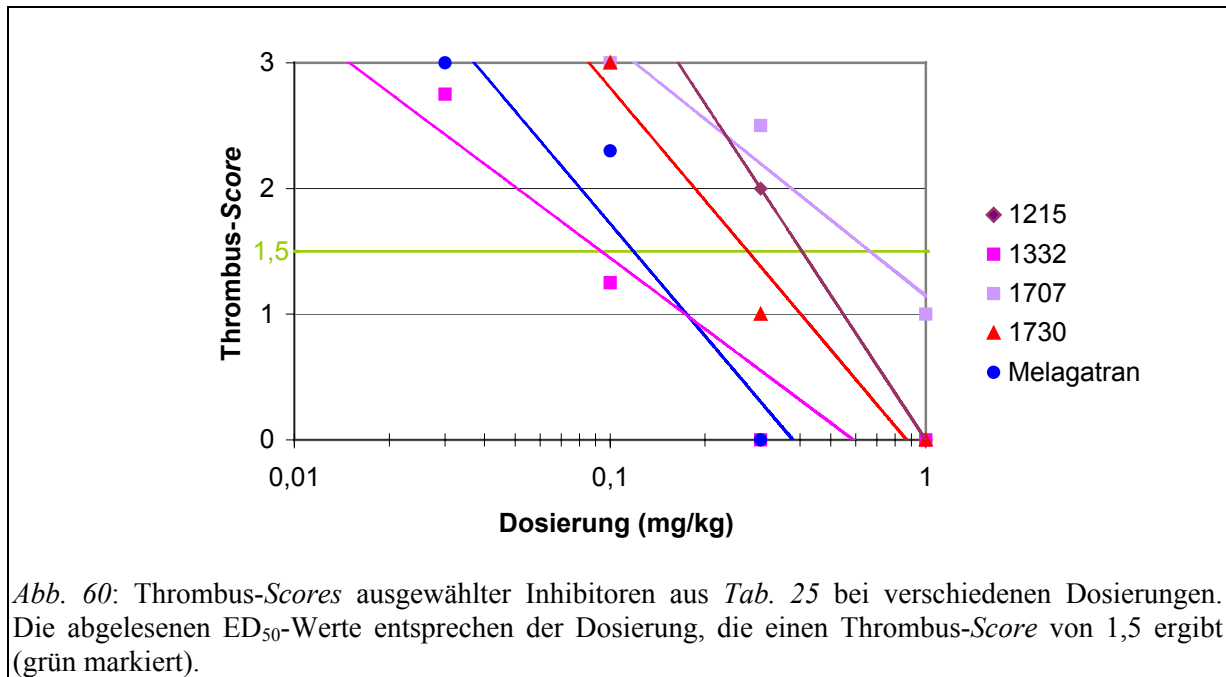


Abb. 60: Thrombus-Scores ausgewählter Inhibitoren aus Tab. 25 bei verschiedenen Dosierungen. Die abgelesenen ED₅₀-Werte entsprechen der Dosierung, die einen Thrombus-Score von 1,5 ergibt (grün markiert).

3. Diskussion

3.1. FXa-Hemmstoffe als Antithrombotika

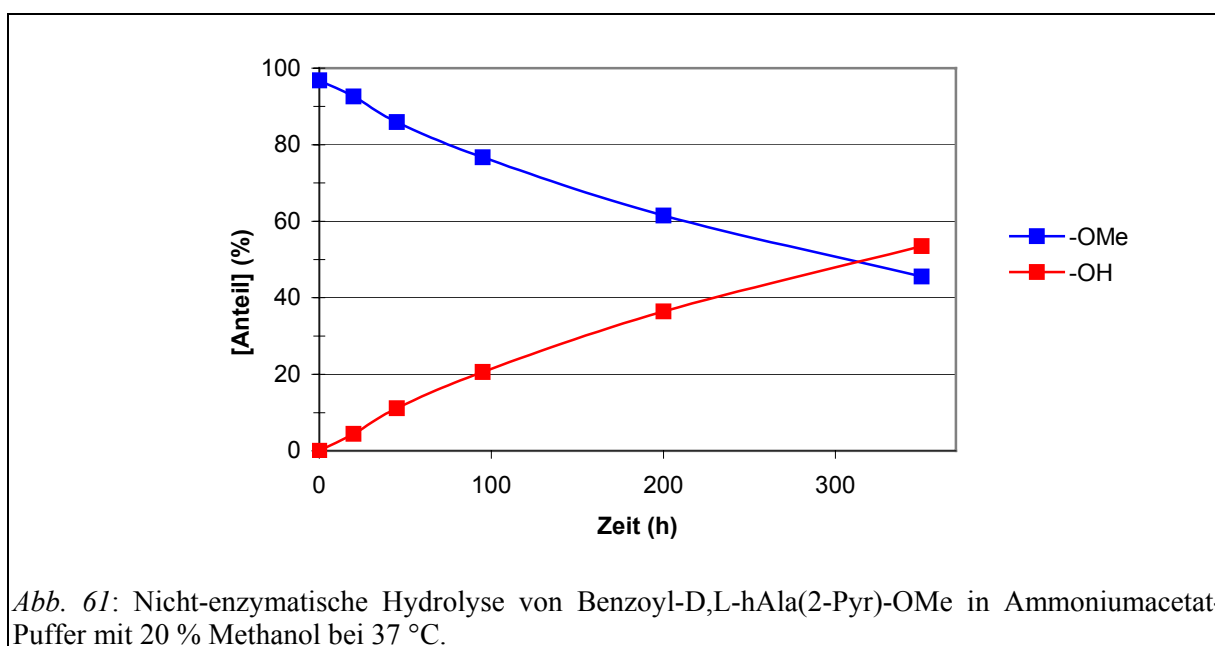
Die Hemmung von FXa, der am Konvergenzpunkt der intrinsischen und extrinsischen Gerinnungskaskade lokalisiert ist, ermöglicht eine effektive Kontrolle der Blutgerinnung und ist möglicherweise vorteilhafter als die Inhibierung anderer Gerinnungsproteasen, speziell des Thrombins. Durch die zentrale Rolle des FXa im Prothrombinasekomplex verhindert eine Inhibierung dieses Enzyms die Thrombinbildung. Außerdem ist FX in ca. 10-fach geringerer Konzentration im Plasma vorhanden als Prothrombin, somit kann eine effektive FXa-Hemmung wahrscheinlich bereits mit niedrigeren Inhibitorkonzentrationen erfolgen. Allerdings ist aufgrund des Wirkmechanismus hauptsächlich eine prophylaktische Anwendung von FXa-Hemmstoffen indiziert, da bereits gebildetes Thrombin, wie bei akuten thromboembolischen Vorfällen (z.B. Herzinfarkt), nicht durch eine Hemmung von FXa beeinflusst werden kann. Wegen des minimalen Effekts auf die Thrombozytenfunktion und die primäre Hämostase ist eine antithrombotische Therapie mit FXa-Inhibitoren vermutlich mit weniger Blutungskomplikationen verbunden, als dies bei der Therapie mit Thrombinhemmstoffen und konventionellen Antikoagulantien der Fall ist [Al-Obeidi u. Ostrem, 1998, 1999; Zhu u. Scarborough, 1999]. Aus diesen Gründen könnte ein oral applizierbarer Inhibitor des Gerinnungsfaktors Xa möglicherweise ein neuartiges Antithrombotikum mit verbesserten Eigenschaften im Vergleich zu den bisher verwendeten Therapieformen sein.

3.2. Synthesestrategie

Die Synthese der Inhibitoren wurde in den meisten Fällen nach einem analogen Schema durchgeführt (*Abb. 20*). Die P4-P3- und P2-P1-Bausteine wurden separat aufgebaut und anschließend mittels PyBOP gekoppelt. Falls notwendig, erfolgte im letzten Schritt eine Hydrierung. Um gezielte Substitutionen einzelner Reste zu erleichtern, wurden einige Verbindungen nach einer abweichenden Strategie synthetisiert (*Abb. 26*). So wurde z.B. für die Variation des P4-Restes zunächst das geschützte P3-P2-P1-Segment hergestellt und direkt mit dem entsprechenden Benzylsulfonyl-Derivat modifiziert. Die Amidinogruppe wurde in den meisten Fällen als Acetylhydroxyamidin geschützt und im letzten Schritt der Synthese durch Hydrierung in das freie Amidin überführt. In Analogie zu Synthesen mit ungeschütztem Arginin [Thamm *et al.*, 2004] wurden in einigen Fällen auch Peptid-Kopplungen mittels PyBOP in Gegenwart einer freien Amidinofunktion durchgeführt. Aufgrund ihres pK_a -Wertes von ca. 11 [Patai u. Rappoport, 1991] ist die Amidinogruppe unter den Bedingungen der PyBOP-Kopplung positiv geladen und daher wenig reaktiv. Signifikante Nebenreaktionen

wurden in diesen Fällen nicht beobachtet.

Mehrere bekannte FXa-Inhibitoren besitzen einen Pyridylring, der in die S3/S4-Tasche des Enzyms bindet [Kamata *et al.*, 1998; Masters *et al.*, 2000]. Deshalb sollten verschiedene Homopyridylalanine mit unterschiedlicher Stellung des Ringstickstoffs in die Grundstruktur eingebaut werden. Da das racemische Boc-4-Homopyridylalanin als einziges Derivat kommerziell erhältlich war, wurden die anderen Homopyridylalanine mittels Strecker-Synthese hergestellt [Ratcliffe *et al.*, 1985]. Aufgrund der Tatsache, dass D-Aminosäuren in P3-Position von FXa bevorzugt werden, wurde außerdem eine Racemattrennung durchgeführt. Wegen der schlechten Löslichkeit des Benzoyl-Aminosäure-Methylesters in dem für die Racemattrennung verwendeten Ammoniumacetat-Puffer bei pH 7,8, wurden 20 % Methanol zugegeben. Nach Beendigung der Reaktion und saurer Hydrolyse der Intermediate wurde die Enantiomerenreinheit mit Marfey's Reagenz kontrolliert [Kochhar u. Christen, 1989]. Dabei zeigte sich, dass in den Fraktionen der D-Aminosäure auch das L-Enantiomer enthalten war. Dies lässt darauf schließen, dass die Spaltung nicht vollständig abläuft und ein Teil der Benzoyl-L-Aminosäure noch als Methylester vorlag. Andererseits wurde festgestellt, dass auch die L-Aminosäure-Fraktion mit D-Derivat verunreinigt war, was darauf hindeutet, dass unter den herrschenden Reaktionsbedingungen auch eine Spaltung des Benzoyl-D-Aminosäure-Methylesters stattfand. Da Serinproteasen normalerweise sehr stereospezifisch wirken, ist eine Spaltung des Methylesters durch Chymotrypsin unwahrscheinlich. Um zu überprüfen, ob eine nicht-enzymatische Hydrolyse des Esters Ursache für die Verunreinigung sein kann, wurde der Benzoyl-Aminosäure-Methylester in Ammoniumacetat-Puffer pH 7,8 mit 20 % Methanol ohne Chymotrypsin über einen längeren Zeitraum inkubiert (Abb. 61).



Es wird deutlich, dass bereits nach 20 h eine signifikante Menge (ca. 5 %) des Esters nicht-enzymatisch hydrolysiert wurde. Nach einer Woche wurden ca. 40 % Spaltprodukt bestimmt und nach 2 Wochen war mehr als die Hälfte des Methylesters umgesetzt. Geringe Verunreinigungen der jeweiligen Fraktionen könnten außerdem während der durchgeführten Fällungs- und Waschprozesse aufgetreten sein.

Da es nicht gelungen war, den Benzoyl-L-Aminosäure-Methylester vollständig zu spalten, wurde untersucht, ob unter den Bedingungen der Chymotrypsinspaltung eine Rückreaktion stattfindet, d.h. ob sich in Gegenwart von Methanol erneut der Methylester der schon gespaltenen Benzoyl-Aminosäure-Derivate bildet. Dafür wurde Benzoyl-Aminosäure mit freier Carboxylgruppe in Ammoniumacetat-Puffer pH 7,8 sowohl mit als auch ohne Chymotrypsin unter Zugabe von 20 % Methanol bei 37 °C inkubiert. Allerdings wurde selbst nach 75 h keinerlei Methylester gefunden, deshalb kann eine Rückreaktion ausgeschlossen werden. Dies lässt vermuten, dass das in der D-Aminosäure-Fraktion noch vorhandene L-Derivat durch eine unvollständige enzymatische Spaltung bedingt ist. Um die Racemattrennung zu optimieren, werden derzeit in der Arbeitsgruppe Versuche mit anderen Enzymen (u.a. D-Hydantoinase) durchgeführt und der Reaktionsverlauf unter veränderten Pufferbedingungen untersucht.

3.3. Eigenschaften der Inhibitoren

Die orale Aufnahme von Arzneistoffen hängt von mehreren Faktoren ab. Von Lipinski wurden mit der „*Rule of Five*“ Regeln definiert, welche die Eigenschaften von potentiell oral verfügbaren Arzneistoffen beschreiben [Lipinski *et al.*, 1997]. Danach sollten Verbindungen:

- nicht mehr als 5 NH- und OH-Gruppen (Wasserstoffbrücken-Donoren) besitzen,
- nicht mehr als 10 Stickstoff- und Sauerstoffatome (Wasserstoffbrücken-Akzeptoren) besitzen,
- das Molekulargewicht sollte kleiner als 500 Da sein,
- und der ClogP-Wert¹² sollte kleiner 5 sein.

Eine weitere wichtige Eigenschaft ist die polare Oberfläche (*Polar Surface Area*, PSA) 3-dimensionaler Strukturen [Palm *et al.*, 1997, 1998]. Durch die Bestimmung der PSA können Rückschlüsse für die Wahrscheinlichkeit der oralen Resorption von Substanzen gewonnen werden (vgl. auch *Tab. 28*, Kapitel 3.4.3.). Da die Berechnung der PSA relativ aufwendig ist, wurde eine Methode entwickelt, nach der die topologische PSA (TPSA)

¹² Der logP-Wert ist ein Maß für die Hydrophilie von Verbindungen. Er gibt an, wie sich eine Substanz in einem Zweiphasengemisch aus Oktanol und Wasser verteilt. Je hydrophiler eine Verbindung ist, umso niedriger ist ihr logP-Wert. Inzwischen existieren mehrere Verfahren, um den logP-Wert zu berechnen (ClogP).

vereinfacht aus 2-dimensionalen Strukturen bestimmt werden kann. Der Berechnung der TPSA liegen Standardwerte für die Oberflächeneigenschaften polarer Gruppen zugrunde [Ertl *et al.*, 2000].

Das Molekulargewicht der Ausgangsinhibitoren **504** und **802** liegt mit 504 Da bzw. 521 Da in einem Bereich, der möglicherweise noch eine orale Resorption gestattet. Beide Verbindungen befinden sich mit 11 bzw. 10 Heteroatomen unmittelbar an der durch Lipinski genannten Grenze. Die Inhibitoren mit einem Pyridyl- (z.B. **1707**) oder Pyridyl-N-Oxid-Substituenten (z.B. **1332**) haben eine erhöhte Anzahl an Heteroatomen (11 bzw. 12) und ein Molekulargewicht von 522 Da bzw. 538 Da. Das Molekulargewicht und die Anzahl der Heteroatome ist bei den Inhibitoren mit Carboxymethylresten in P4- oder Glu in P3-Position (z.B. **797** oder **762a**) deutlich erhöht. Mit molaren Massen von 367-471 Da und nur 7 Heteroatomen besitzen die Verbindungen **718**, **719** und **726** mit Arylalkylresten in P4-Position bzw. **755** ohne jeden P4-Rest (*Tab. 3*) theoretisch bessere Chancen auf eine orale Verfügbarkeit, allerdings sind sie inhibitorisch praktisch unwirksam ($K_i > 3,0 \mu\text{M}$).

Die meisten untersuchten Inhibitoren mit D-hPhe-Analoga in P3-Position besitzen eine akzeptable Hydrophilie und Löslichkeit. Jedoch wurde festgestellt, dass die Inhibitoren mit D-hTyr als P3-Aminosäure, vor allem in Kombination mit Glu in P2-Position, trotz freier Amidinogruppe in Wasser oder Puffer deutlich schlechter löslich sind. Diese Eigenschaften erschweren die Tierversuche und machen generell eine orale Bioverfügbarkeit unwahrscheinlich, da sich die höchste Einzeldosis einer sehr leicht löslichen Substanz in 250 ml Wasser lösen sollte [FDA-Richtlinie¹³; Lipinski, 2001]. Bei einem 70 kg schweren Menschen und einer Dosierung von 5 mg/kg wären dementsprechend etwa 350 mg der hier aufgeführten Hemmstoffe zu applizieren. Um diese Menge in 250 ml Wasser zu lösen, ist eine Mindestlöslichkeit von $> 1 \text{ mg/ml}$ erforderlich. Die Einteilung der Löslichkeit von Substanzen laut DAB ist in *Tab. 26* wiedergegeben. Untersuchungen mit Verbindung **745** (Bzls-D-hTyr-Gly-4-Amidinobenzylamid; *Tab. 10*) hatten eine Löslichkeit von $< 1 \text{ mg/ml}$ ergeben - nach DAB ist die untersuchte Verbindung sehr schwer löslich. Im Vergleich zu den D-hTyr-Verbindungen zeigen die Hemmstoffe mit hAla(Pyr) und hAla(Pyr-NO) ein deutlich verbessertes Lösungsverhalten ($> 5 \text{ mg/ml}$), die Löslichkeit dieser Inhibitoren konnte jedoch nicht genauer bestimmt werden, da keine ausreichenden Substanzmengen zur Verfügung standen.

¹³ Guidance for Industry, Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. (*Internet*) <http://www.fda.gov>

Tab. 26 - DAB-Klassifikation der Löslichkeit von Substanzen.

Bezeichnung	Volumenteile Lösungsmittel je Massenteil Substanz	ungefähre Löslichkeit in Wasser ¹⁴ (mg/ml)
sehr leicht löslich	< 1 Teil	≥ 1000
leicht löslich	1-10 Teile	100-1000
löslich	10-30 Teile	33-100
wenig löslich	30-100 Teile	10-33
schwer löslich	100-1000 Teile	1-10
sehr schwer löslich	1000-10000 Teile	0,1-1
praktisch unlöslich	> 10000 Teile	≤ 0,1

3.4. Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Das Ziel dieser Arbeit war, ausgehend von einer bekannten Leitstruktur durch Modifizierung der einzelnen Segmente des Hemmstoffes eine Verbesserung der Wirksamkeit und des pharmakokinetischen Profils zu erreichen. Aus früheren Untersuchungen mit peptidomimetischen Benzamidin-Derivaten war bekannt, dass hydrophobe Substanzen dieser Klasse nach Aufnahme in die Leber über die Galle eliminiert werden [Eckhardt *et al.*, 1996a, 1996b; Hauptmann *et al.*, 2002]. Daher wurde versucht, die Hydrophilie der Hemmstoffe zu erhöhen, wobei Substituenten mit pK_a-Werten nahe des physiologischen pH-Bereiches eingebaut wurden. Andererseits wurden auch polare oder geladene Reste verwendet, die einen Schutz als Prodrug gestatten.

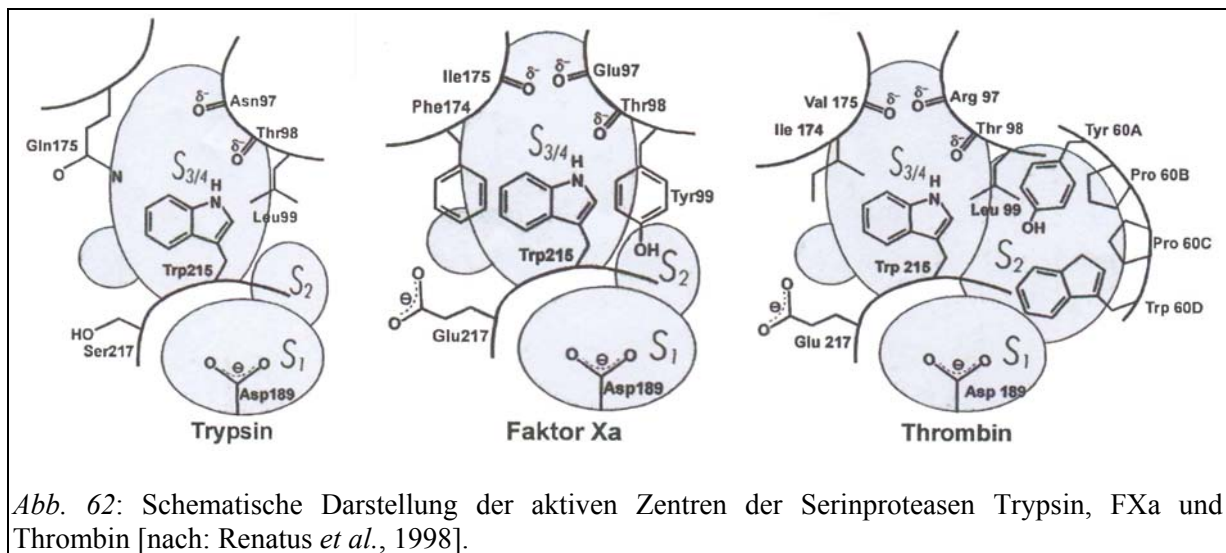
Durch Variation des Gly in P2-Position gelang es nicht, Inhibitoren mit verbesserter Selektivität und Affinität zu entwickeln. Allerdings zeigen die Hemmstoffe mit Glu oder Ser in P2-Position ein leicht verzögertes Eliminationsverhalten. Die Modifizierung der hydrophoben bzw. aromatischen Seitenkette der P3-Aminosäure mit polaren oder schwach basischen Resten führte in einigen Fällen zu wirksamen und selektiven Hemmstoffen, die auch relativ langsam eliminiert werden. Durch Substitution des P4-Restes konnte die Selektivität und Affinität der Hemmstoffe nicht verbessert werden.

Viele Ergebnisse lassen sich anhand des angenommenen Bindungsmodus der Inhibitoren im aktiven Zentrum des FXa erklären.

¹⁴ Die einfache Umrechnung in mg/ml ist nur für Wasser möglich, da dort 1 g auch ca. 1 ml entspricht. Für andere Lösungsmittel müsste eine Berechnung anhand der Dichte vorgenommen werden.

3.4.1. Struktur des FXa und Bindungsmodus Substrat-analoger Hemmstoffe

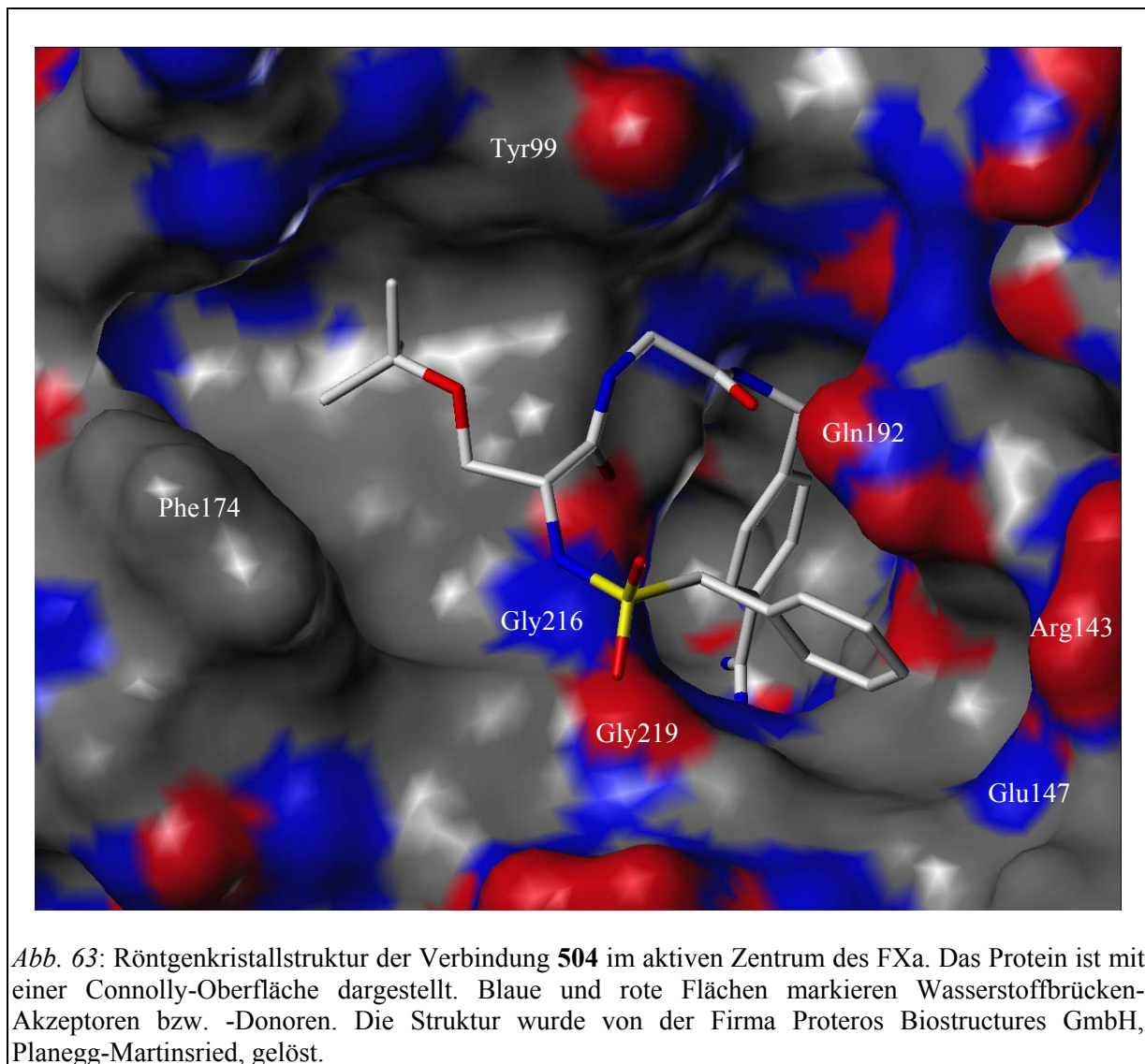
Die Röntgenstruktur des FXa wurde Mitte der 90er Jahre aufgeklärt [Padmanabhan *et al.*, 1993; Brandstetter *et al.*, 1996], wodurch eine Struktur-basierte Entwicklung neuer Hemmstoffe möglich wurde. FXa gehört zur Familie der Chymotrypsin-artigen Serinproteasen und ist mit anderen Vertretern dieser Familie strukturell verwandt (Abb. 62) [Bode *et al.*, 1997]. Wie bei allen Proteasen der Chymotrypsin-Familie wird die katalytische Triade von FXa aus den Aminosäuren Asp102, His57 und Ser195 gebildet. Das aktive Zentrum besteht aus mehreren Bindungsbereichen, einer sehr charakteristischen S1-Tasche und einer stark ausgeprägten Aryl-Bindungsregion (S3/S4), während die S2-Tasche sterisch eingeschränkt ist.



Am Boden der S1-Tasche befindet sich die Seitenkette des negativ geladenen Asp189, die mit der basischen P1-Aminosäure von Substraten oder Inhibitoren eine Salzbrücke ausbildet. Deshalb besitzen natürliche FXa-Substrate ein Arg oder Lys in P1-Position, Prothrombin wird z.B. zwischen Arg323 (P1) und Ile324¹⁵ (P1') gespalten [Brandstetter *et al.*, 1996]. Der P1-Rest der meisten FXa-Inhibitoren ist ein Arginin-Mimetikum, in vielen Fällen handelt es sich dabei um ein Benzamidin-Derivat. Neuere Inhibitorentwicklungen haben jedoch gezeigt, dass auch hydrophobe Reste, wie z.B. Halogen-substituierte Aromaten, in P1-Position akzeptiert werden, während die Wirksamkeit der Inhibitoren erhalten bleibt [Quan u. Smallheer, 2004]. Die S2-Bindungstasche des FXa ist durch Tyr99 sterisch blockiert, deshalb ist Gly die bevorzugte P2-Aminosäure. Die S3/S4-Tasche wird von drei aromatischen Resten am Boden (Trp215) und an den Seiten (Tyr99 and Phe174) ausgebildet. In diese Tasche

¹⁵ Der Rest Ile324 entspricht nach der Chymotrypsin-Nummerierung dem Aminosäurerest Ile16 des Thrombins [Bode *et al.*, 1989].

binden vor allem hydrophobe, aromatische und, aufgrund von Kation- π -Interaktionen [Lin u. Johnson, 1995; Schärer *et al.*, 2005], auch positiv geladene Seitenketten. Daher wurden von vielen Gruppen Hemmstoffe entwickelt, die in P4-Position entweder einen basischen, z.B. BABCH; DX-9065a [Stürzebecher *et al.*, 1989; Hara *et al.*, 1995], oder einen neutralen Rest, z.B. EMD 495235; BAY 59-7939 [Mederski *et al.*, 2004b; Perzborn *et al.*, 2005], besitzen. Die Bindung Substrat-analoger Inhibitoren wird durch Interaktionen mit dem Rückgrat der P3-Aminosäure zu Gly216 zusätzlich stabilisiert, wobei beide Peptidstränge ein kurzes antiparalleles β -Faltblatt ausbilden. Als Ausgangspunkt für diese Arbeit diente die bereits gelöste Röntgenkristallstruktur der Verbindung **504** (Tab. 1) im aktiven Zentrum des FXa (Abb. 63).



Der 4-Amidinobenzylamidrest bindet tief in die S1-Tasche des Enzyms und die Seitenkette des D-Ser(tBu) ist in die S3/S4-Tasche gerichtet. Das P2-Gly hat eine Linker-Funktion, sein

Carbonyl-Sauerstoff kann eine Wasserstoffbrücke zum Amid-Stickstoff des Gln192 ausbilden (Abstand der Heteroatome: 2,94 Å). Ein Sulfonyl-Sauerstoff P4-Gruppe bildet eine Wasserstoffbrücke zum Amid-Stickstoff des Gly219 aus (3,12 Å), während der P4-Phenylring in eine zusätzliche flache, hydrophobe Bindungstasche am FXa bindet, die auch in anderen Proteasen der Chymotrypsin-Familie existiert und erstmals für Thrombin beschrieben wurde [Tucker *et al.*, 1997].

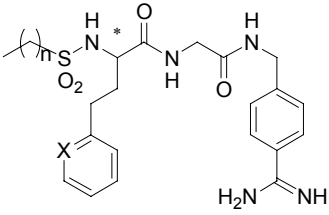
3.4.2. Affinität und Selektivität

Modifizierung der P4-Position

Um die Voraussetzungen für eine orale Aufnahme zu verbessern, sollten Inhibitoren mit einem Molekulargewicht von maximal 500 Da synthetisiert werden („*Rule of Five*“). Aus diesem Grund wurden in einer ersten Serie die Verbindungen **718**, **719** und **726** durch Alkylierung des Stickstoffatoms der P3-Aminosäure mit Arylalkylgruppen synthetisiert. Zusätzlich wurde Verbindung **755** hergestellt, die keinerlei P4-Rest mehr besitzt. Diese Substanzen zeigen jedoch nur noch eine sehr schwache Hemmwirkung auf FXa (*Tab. 3*). Aus der Röntgenstruktur des Inhibitors **504** in FXa (*Abb. 63*) ist bekannt, dass ein Sauerstoff der P4-Sulfonylgruppe eine Wasserstoffbrücke zu Gly 219 ausbildet [Tucker *et al.*, 1997; Schweinitz *et al.*, 2004]. Deshalb wird vermutet, dass der Verlust dieser Bindung und die damit verbundene erhöhte Flexibilität des P4-Restes eine Ursache für den starken Affinitätsverlust gegenüber FXa sein könnte. Da dieser gravierende Effekt auf die Hemmaktivität nicht zu kompensieren war, wurde die Strategie der Eliminierung der Sulfonylfunktion im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt. Um das Molekulargewicht der Verbindungen zu reduzieren, wurden in der Arbeitsgruppe Hemmstoffe mit aliphatischen Sulfonylresten synthetisiert (*Tab. 27*). Diese erst kürzlich erhaltenen Ergebnisse waren nicht Teil dieser Arbeit, sie sollen hier aber genannt werden.

Der Austausch des Benzylsulfonylrestes durch bestimmte Alkylsulfonylreste führte in Kombination mit D,L-hAla(2-Pyr) und D,L-hAla(2-Pyr-NO) als P3-Aminosäure ebenfalls zu wirksamen Inhibitoren, obwohl deren Affinität im Vergleich zu den Verbindungen **1215** bzw. **1332** ($K_i = 0,68$ nM bzw. $0,32$ nM; *Tab. 19*) deutlich reduziert ist.

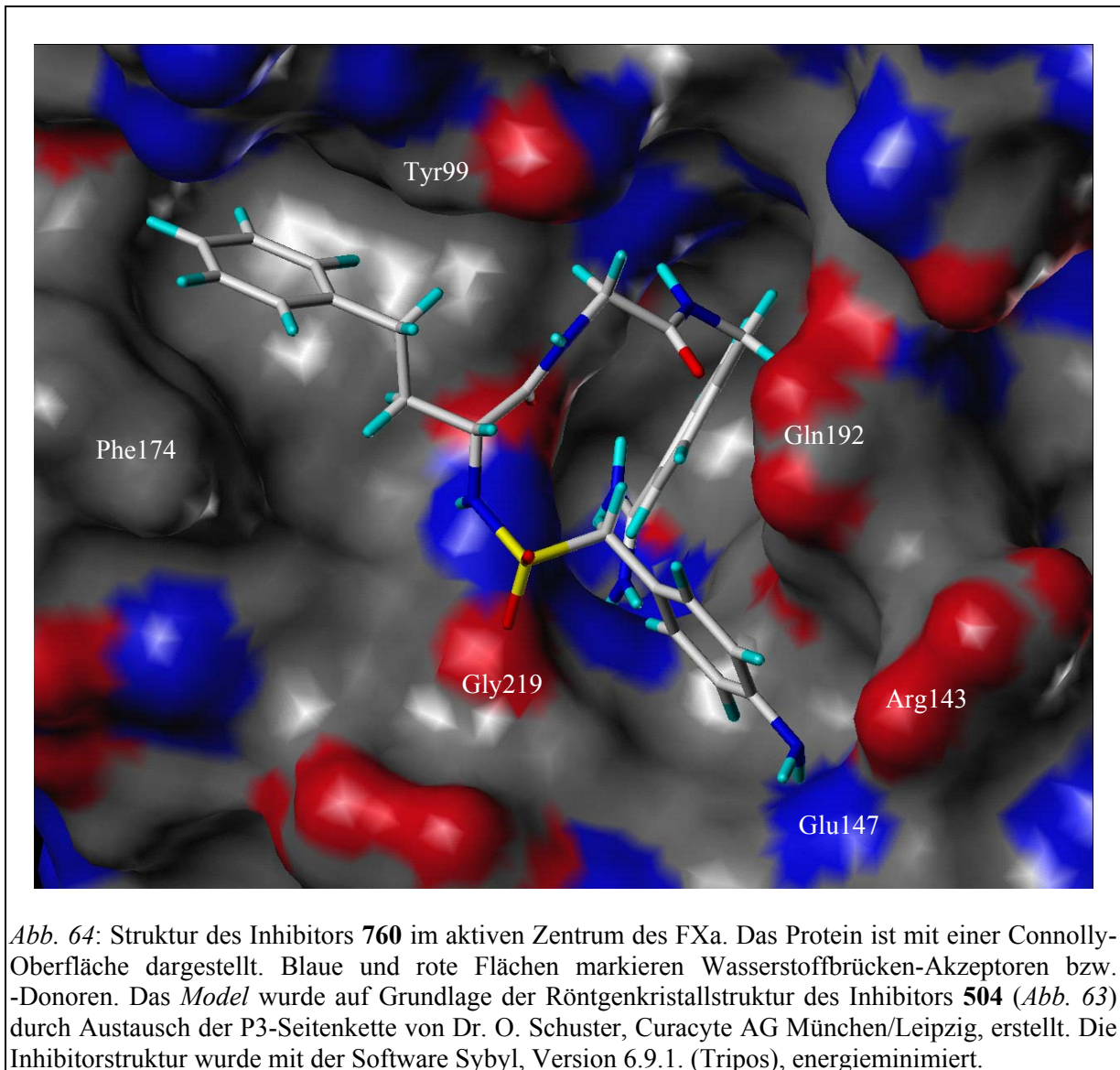
Tab. 27 - Hemmkonstanten der Inhibitoren mit Alkylsulfonylresten

Nr.							
	n	X	K _i (μM)				
			FXa	Thrombin	Plasmin	uPA	Trypsin
1126	1	N	0,032	24	28	26	0,12
1131	1	N ⁺ -O ⁻	0,024	79	21	51	0,18
1226	2	N	0,013	21	11	16	0,13
1228	2	N ⁺ -O ⁻	0,0077	44	9,2	20	0,079
1230	3	N	0,0049	n.b.	4,0	8,9	0,022
1233	3	N ⁺ -O ⁻	0,0034	9,5	4,6	11	0,021

(* racemisch; n.b. = nicht bestimmt)

Die Hemmkonstanten dieser Verbindungen sind stark von der Kettenlänge des Alkylrestes abhängig: Der Einbau des Butylsulfonylrestes führte zu Inhibitoren mit K_i-Werten von 4,9 und 3,4 nM. Die analogen Propylsulfonyl-Verbindungen sind weniger wirksam, zeigen jedoch noch Hemmkonstanten von 13 und 7,7 nM. Kürzere P4-Alkylketten bewirkten einen stärkeren Affinitätsverlust (K_i > 20 nM). Die Butylsulfonyl-Verbindung mit D-hAla(2-Pyr-NO) in P3-Position wurde in Ratten relativ rasch aus der Blutzirkulation eliminiert, allerdings ist die Eliminierung der Propylsulfonyl-N-Oxid-Verbindung mit der des Inhibitors **1332** vergleichbar. Eine mögliche orale Resorption des zugehörigen Prodrugs wird zur Zeit untersucht.

In Analogie zu der strukturell verwandten Serie von Urokinasehemmstoffen [Schweinitz *et al.*, 2004] sollten polarere Reste in die Inhibitoren integriert werden, um deren Eliminationsgeschwindigkeit zu reduzieren. Zu den untersuchten Substituenten am P4-Bzls-Ring gehörten Carboxymethyl-, Nitro- oder Aminogruppen, außerdem wurde der Phenylring durch Pyridyl- und Pyridyl-N-Oxid-Gruppen ersetzt. Der Einbau von Carboxymethyl- oder Nitro-Substituenten ergab in den meisten Fällen weniger wirksame Hemmstoffe (z.B. **739**; **759**), jedoch gelang es in einigen Kombinationen mit Aminogruppen in *para*-Position, die Hemmwirkung auf FXa geringfügig zu verbessern (z.B. **760**, Abb. 64).

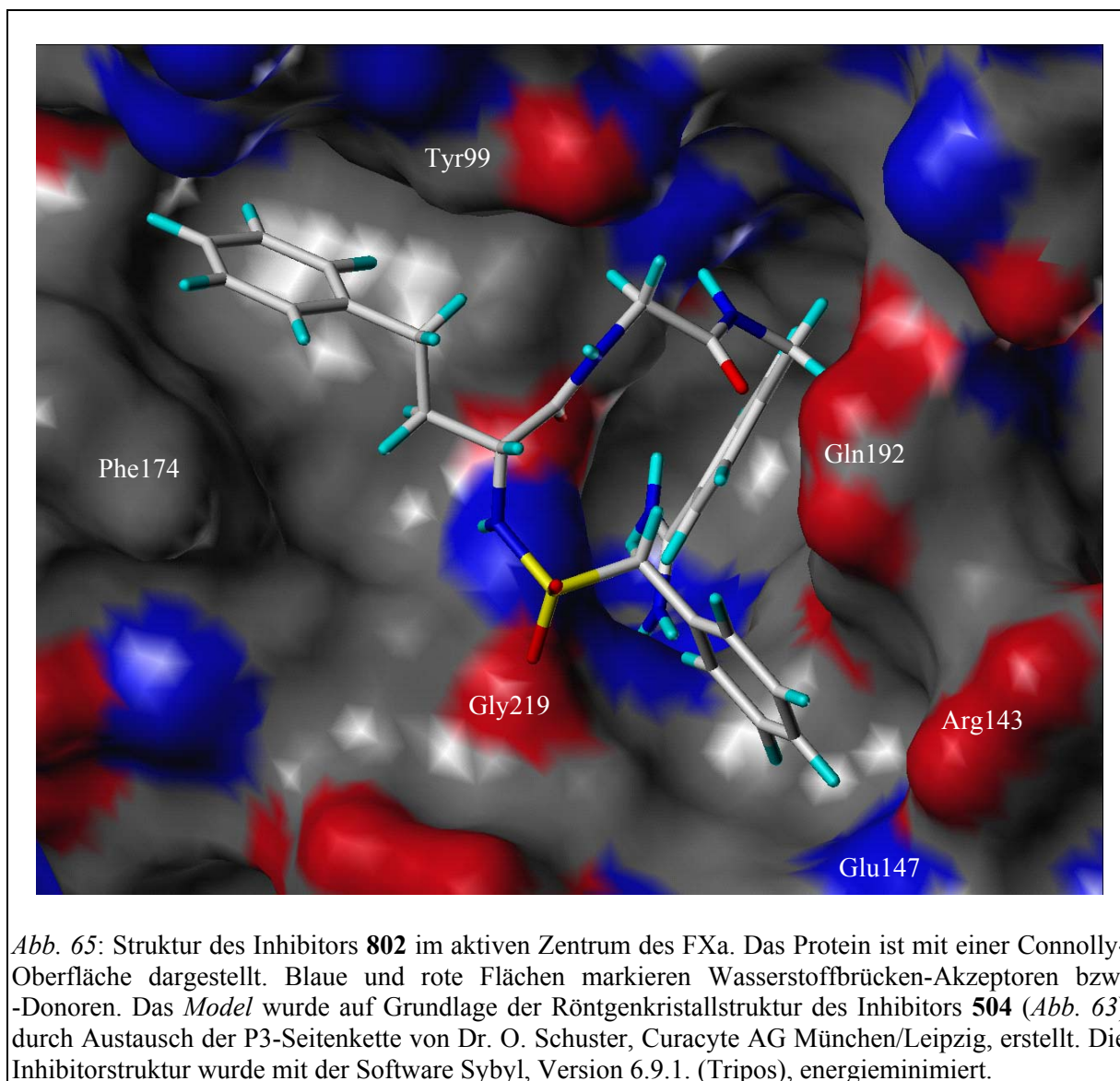


Eine anilinische Aminogruppe sollte aufgrund ihres pK_a -Wertes von 4,6 bei physiologischem pH-Wert ungeladen sein. Unter Annahme einer pyramidalen Konformation (Abb. 64) [López-Tocón *et al.*, 2004] beträgt der Abstand zum Carbonyl-Sauerstoff des Glu147 2,7 Å und deutet auf die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke hin. Dies könnte den leichten Anstieg der Affinität im Vergleich zur unsubstituierten Verbindung erklären.

Die Substitution des P4-Phenylrings durch Pyridyl- und Pyridyl-N-Oxid-Ringe führte wiederum zu einem stärkeren Wirkverlust der Inhibitoren gegenüber der Ausgangsverbindung **802**, die schwächste FXa-Hemmung wurde für die Verbindung beobachtet, bei der die N-Oxid-Funktion in *para*-Position lokalisiert ist (*Tab. 9 und Tab. 18*). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass negativ polarisierte Gruppen bzw. Reste mit Wasserstoffbrücken-Akzeptor-Funktion, besonders in *para*-Position, die Bindung des P4-Benzylsulfonylestes in der *Subpocket* stören. Möglicherweise kommt es nach Einbau bestimmter Substituenten auch zu einer sterischen Beeinflussung der Inhibitorbindung.

Modifizierung der P3-Position

Am P3-Rest wurden umfangreiche Variationen vorgenommen, um die Affinität und das Eliminationsverhalten der Hemmstoffe zu verbessern. Die Seitenkette der P3-Aminosäure bindet in die S3/S4-Tasche des FXa, die neben basischen auch hydrophobe aromatische Reste akzeptiert [Maignan u. Mikol, 2001, Quan u. Smallheer, 2004]. Dabei hat die Länge der Seitenkette einen starken Einfluss auf die Affinität der Hemmstoffe. Die unterschiedlichen K_i -Werte der in *Tab. 2* aufgeführten Verbindungen mit D-Phenylglycin, D-Phenylalanin, D-Homophenylalanin und D-Phenylpropylglycin zeigen eine Präferenz des FXa für Inhibitoren mit einer aromatischen Homoaminosäure in diesem Bereich. Den Einfluss der Kettenlänge erkennt man auch beim direkten Vergleich der Hemmstoffe **725** mit D-3-Pyridylalanin ($K_i = 51 \text{ nM}$, *Tab. 4*) und **1734** mit D-3-Homopyridylalanin ($K_i = 1,9 \text{ nM}$, *Tab. 13*). Im Vergleich zu Verbindungen mit D-Phe, dem klassischen P3-Rest synthetischer Thrombinhemmstoffe [Steinmetzer *et al.*, 2001; Steinmetzer u. Stürzebecher, 2004], besitzen Inhibitoren vom D-hPhe-Typ außerdem eine verbesserte Selektivität gegenüber Thrombin (vgl. *Tab. 2*; **802**: $K_i \text{ Thrombin} / K_i \text{ FXa} = 7,8$ - **635**: $K_i \text{ Thrombin} / K_i \text{ FXa} = 0,87$). Die Länge der P3-Seitenkette der Inhibitoren vom D-hPhe-Typ scheint optimale Interaktionen mit den aromatischen Resten der Aryl-Bindungstasche zu ermöglichen: Im *Model* des Inhibitors **802** im Komplex mit FXa bilden die aromatischen Aminosäuren Tyr99 und Phe174 eine „Sandwich-artige“ Struktur mit dem Phenylring der Seitenkette des D-hPhe aus (*Abb. 65*).



Die Substitution der *para*-Position des Phenylrings mit einer Hydroxylgruppe im Falle der D-hTyr-Derivate führte zu einem leichten Anstieg der Wirksamkeit (**745**, $K_i = 3,0$ nM). Das lässt vermuten, dass die OH-Gruppe sterisch akzeptiert wird und möglicherweise eine zusätzliche Wasserstoffbrücke, entweder direkt oder über ein Wassermolekül vermittelt, zu den Carbonylgruppen der Reste Glu97, Thr98 oder Ile175 ausbildet.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch durch Einbau eines Pyridylrings anstelle des Phenylrestes erhalten. Die Derivate mit racemischem 3- und 4-Homopyridylalanin zeigen mit Hemmkonstanten von 4,0 und 7,1 nM eine ähnliche Wirksamkeit wie Inhibitor **802**, während durch Einbau des D,L- oder D-2-Homopyridylalanins die Hemmwirkung sogar verstärkt wurde ($K_i < 1,0$ nM). Im Falle des D,L-4-Homopyridylalanins ist denkbar, dass der Pyridyl-Stickstoff eine über Wasser vermittelte Wasserstoffbrücke zu den Carbonyl-Sauerstoffen der Reste Glu97, Thr98 oder Ile175 ausbildet, wie es auch für eine Struktur mit einem ähnlichen

P4-Rest (4-Pyridylamino-pentansäure) beschrieben wurde [Kamata *et al.*, 1998; Maignan u. Mikol, 2001]. Diese möglichen Wasserstoffbrücken haben aber nur einen unwesentlichen Einfluss auf die Affinität des Inhibitors.

Die Oxidation der Pyridyl-Stickstoffe zum N-Oxid führt nur bei dem Inhibitor mit D,L- bzw. D-2-Homopyridylalanin zu einem weiteren Anstieg der Affinität. Für die racemischen 3- und 4-Homopyridylalanin-N-Oxid-Verbindungen wurde die Hemmwirkung deutlich reduziert. Eine Ursache für die vergleichsweise schwächere Affinität der 4- und 3-substituierten Inhibitoren könnte die starke Polarisierung des N-Oxid-Sauerstoffs sein, die möglicherweise beim D,L- bzw. D-hAla(2-Pyr-NO)-Derivat keine Rolle spielt, da sich die N-Oxid-Funktion im Vergleich zum hAla(4-Pyr-NO)-Derivat zum Lösungsmittel orientieren kann (*Abb. 66*). Möglicherweise beeinträchtigen auch die veränderten elektronischen Verhältnisse der *meta*-Substitution des Aromaten im Falle des hAla(3-Pyr-NO)-Derivates die Bindung am Enzym.

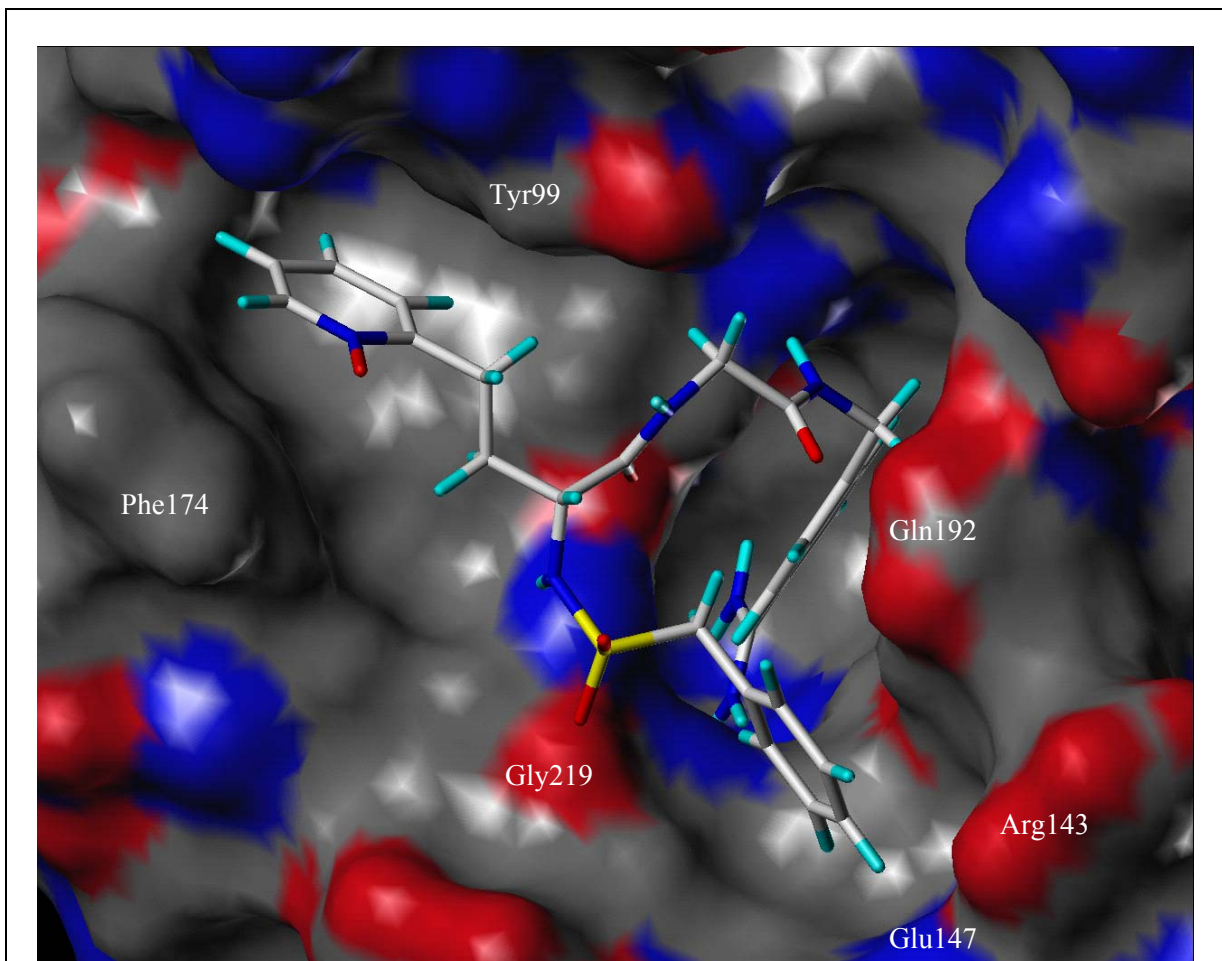


Abb. 66: Struktur des Inhibitors **1332** im aktiven Zentrum des FXa. Das Protein ist mit einer Connolly-Oberfläche dargestellt. Blaue und rote Flächen markieren Wasserstoffbrücken-Akzeptoren bzw. -Donoren. Das *Model* wurde auf Grundlage der Röntgenkristallstruktur des Inhibitors **504** (*Abb. 63*) durch Austausch der P3-Seitenkette von Dr. O. Schuster, Curacyte AG München/Leipzig, erstellt. Die Inhibitorstruktur wurde mit der Software Sybyl, Version 6.9.1. (Tripos), energieminiert.

Eine sterische Beeinflussung der Hemmstoffbindung im Falle des D,L-hAla(4-Pyr-NO)-Derivates ist dagegen unwahrscheinlich, da auch Inhibitor **745** mit D-hTyr in P3-Position gut akzeptiert wird. Basierend auf der in *Abb. 66* gezeigten Struktur ist auch bei der analogen 3-Homopyridylalanin-N-Oxid-Verbindung ist sterischer Effekt nicht zu erwarten. Da hier jedoch keine direkte Vergleichssubstanz existiert, kann dies nur vermutet werden.

Modifizierung der P2-Position

In P2-Position wurde versucht, durch Einbau von Aminosäuren mit polaren oder geladenen Seitenketten, wie Ser oder Glu, die Eliminationsgeschwindigkeit der Hemmstoffe zu reduzieren. Werden Glu oder Ser mit D-hPhe oder anderen aromatischen Homoaminosäuren in P3-Position kombiniert, kommt es in den meisten Fällen zu einem Affinitätsverlust (*Tab. 5 und Tab. 10*). Da die S2-Region von FXa aufgrund des Aminosäurerestes Tyr99 im Vergleich zu einigen anderen Trypsin-artigen Serinproteasen sterisch deutlich eingeschränkt ist, wird vor allem Gly als P2-Rest in Substrat-analogen Strukturen akzeptiert. FXa akzeptiert auch Prolin, das ein bevorzugter P2-Rest in Thrombinhemmstoffen ist. Allerdings führte der Einbau dieser Aminosäure zu sehr unspezifischen Inhibitoren, die neben Thrombin auch Plasmin sehr stark hemmen (*Tab. 14*). Im Vergleich zu Ser wurde Glu in P2-Position besser toleriert: Möglicherweise stört vor allem die polare Hydroxylgruppe in dieser Position der Seitenkette des Ser die Bindung am Enzym, während sich aufgrund der größeren Distanz zum C α -Atom die flexible Seitenkette des Glu mit der Carboxylgruppe zum Lösungsmittel ausrichten kann.

Neben der verminderten Affinität zeigen vor allem die Inhibitoren mit P2-Ser einen Selektivitätsverlust gegenüber Plasmin (z.B. **744a**: $K_i \text{ Plasmin}/K_i \text{ FXa} = 1,83$). Obwohl Glu in P2-Position ebenfalls zu einer stärkeren Plasminhemmung führt, sind die Verbindungen noch relativ spezifische FXa-Hemmstoffe (z.B. **762a**: $K_i \text{ Plasmin}/K_i \text{ FXa} = 59,5$). Wie die meisten Chymotrypsin-artigen Serinproteasen besitzt FXa einen *loop*, der u.a. den Rest Tyr99* enthält und die S2-Tasche sterisch einschränkt. Ein Sequenz-*alignment* zeigt, dass bei Plasmin die Aminosäurereste 95-100 deletiert sind (*Abb. 67*).

	70	80	90	*100	110	120
Chymotrypsinogen	-VVVAGEFDQGSDEENIQVLKIAKVFKNPKFSILTVNNDITLLKLATPARFSQTVSAVC-					
Faktor Xa	--VRVGDNRNTEQEEGGEAVHEVEVVIKHNRFTKETYDFDIAVLRRLKTPITFRMNVAPAC-					
Plasmin	--VILGAHQEVNLEPHVQEIIEVSRLFLEPTR-----KDIALLLKSSPAVITDKVIPAC-					

Abb. 67: Auszug aus dem Sequenz-*alignment* ausgewählter humaner Serinproteasen unter Verwendung der Chymotrypsin-Nummerierung [Bode *et al.*, 1989]. (* Rest 99)

Dadurch sind in Plasmin die S2- und S3/S4-Tasche nicht voneinander getrennt und bilden eine weit offene Bindungsregion [Parry *et al.*, 1998; Rester *et al.*, 1999]. Als Konsequenz akzeptiert Plasmin auch größere P2-Aminosäuren. Im Gegensatz zu FXa und den meisten anderen Gerinnungsfaktoren, die sehr spezifisch wirken, ist Plasmin unspezifisch und kann viele verschiedene Substrate spalten.

Bei der Entwicklung des Thrombinhemmstoffes Melagatran wurde gezeigt, dass bei Inhibitoren mit Plasmin-Hemmkonstanten $< 0,5 \mu\text{M}$ als Nebenwirkung die Fibrinolyse zu stark gehemmt und dadurch ihre gerinnungshemmende Wirkung vermindert wird [Gustafsson *et al.*, 1998]. Daher wurde auch im Rahmen dieser Arbeit versucht, Inhibitoren zu entwickeln, die eine möglichst geringe Plasminhemmung aufweisen. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf der Arbeit auf den Einbau von Ser und Glu verzichtet; eine verzögerte Eliminierung der Inhibitoren konnte auch durch die Pyridyl-N-Oxid-Funktion erreicht werden.

Modifizierung der P1-Position

Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine strukturellen Veränderungen am P1-Rest vorgenommen. Jedoch ist aus weiteren Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe bekannt, dass in Kombination mit dem P4-P3-P2-Segment des Inhibitors **1332** ein Austausch des 4-Amidinobenzylamids durch andere aromatische Reste, wie z.B. 2,5-Dichlorbenzylamid oder 2-Amino-5-Amidomethylpyridin, möglich ist. Allerdings wurden diese Derivate trotz akzeptabler FXa-Hemmung ($K_i = 10\text{-}20 \text{ nM}$) relativ schnell aus der Zirkulation von Ratten eliminiert und sind daher keine Alternative zur Leitsubstanz **1332**.

3.4.3. Pharmakokinetik

Es ist bekannt, dass bestimmte Benzamidin-Verbindungen mit zusätzlichen stark geladenen Gruppen langsamer aus der Zirkulation von Ratten eliminiert werden [Hauptmann *et al.*, 2002]. Eine verlangsamte Eliminationskinetik wurde auch für mehrere im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte Inhibitoren gefunden, die, wie z.B. **1332**, neben der basischen Amidinofunktion weitere polare Gruppen besitzen.

Als Referenzverbindung für die pharmakokinetischen Untersuchungen wurde DX-9065a der Firma Daiichi verwendet, da auch DX-9065a eine relativ langsame Eliminierung aufweist (*Abb. 18*) [Hara *et al.*, 1995]. Erst kürzlich wurden Ergebnisse klinischer Studien mit DX-9065a veröffentlicht [Alexander *et al.*, 2005].

Plasmaspiegel

Es ist notwendig, dass Arzneistoffe für eine effektive Wirkung ausreichend lange und in ausreichender Menge in der Zirkulation von Patienten vorhanden sind. Es ist das Ziel, den für die Wirksamkeit notwendigen Plasmaspiegel mit möglichst wenigen über den Tag verteilten Gaben (idealerweise 2-3) zu erreichen und aufrechtzuerhalten. Während ein Unterschreiten der effektiven Wirkstoffkonzentration nicht zur gewünschten Wirksamkeit führt, kann ein Überschreiten dieser Grenze Nebenwirkungen und toxische Effekte zur Folge haben. Bei Gerinnungshemmstoffen kann so das Thromboserisiko entweder weiterhin bestehen bleiben oder es kann zu lebensbedrohlichen Blutungskomplikationen kommen [Ansell *et al.*, 2001].

In Analogie zu früheren Ergebnissen mit Thrombinhemmstoffen wurde als Grenze für eine ausreichende Wirksamkeit in den durchgeführten Eliminierungsstudien an der Ratte ein Plasmaspiegel der Wirksubstanz von ca. 0,2 µg/ml angestrebt. Dieser Richtwert ergibt sich aus den IC₂₀₀-Werten der Inhibitoren für die aPTT: Um *in vivo* eine ausreichende anti-thrombotische Wirksamkeit zu erreichen, sollte die Plasmakonzentration der Hemmstoffe in etwa ihrem aPTT-Wert entsprechen [Hauptmann, 2002]. Die im aPTT-Test ermittelten IC₂₀₀-Werte für die wirksamsten FXa-Inhibitoren liegen zwischen 0,3 und 0,5 µM. Bei Substanzen mit einem Molekulargewicht von ca. 500 Da ergibt sich daraus eine Plasmakonzentration von 0,15-0,25 µg/ml, die z.B. von Inhibitor **1215** nach *i.v.*-Applikation einer Dosis von 1 mg/kg über einen Zeitraum von 3,5 h aufrecht erhalten werden konnte (Abb. 53). Die meisten anderen untersuchten Verbindungen werden deutlich schneller eliminiert und sind für eine Weiterentwicklung ungeeignet.

Orale Bioverfügbarkeit

Erst kürzlich veröffentlichte Daten statistischer Untersuchungen mit momentan zugelassenen Arzneimitteln beschreiben, dass ca. 80 % der oral verfügbaren Substanzen ein Molekulargewicht von 200-475 Da und maximal 9 Heteroatome besitzen [Vieth *et al.*, 2004]. Ausgewählte physikalische und strukturelle Eigenschaften der 1193 untersuchten oral verfügbaren Arzneistoffe im Vergleich zum Prodrug **1331** sind in Tab. 28 zusammengefasst. Die Bereiche, denen die Verbindung **1331** zugeordnet werden kann, sind gelb markiert.

Das Molekulargewicht und die Anzahl der Heteroatome der Verbindung **1331** liegen innerhalb des Bereichs, in dem sich 90 % aller zugelassenen oral verfügbaren Arzneistoffe befinden. Andererseits sind die Werte für die PSA sowie die Anzahl der OH- und NH-Gruppen relativ hoch und wirken sich wahrscheinlich nachteilig auf die orale Bioverfügbarkeit aus.

Tab. 28 - Ausgewählte physikalische Eigenschaften von 1193 zugelassenen oralen Arzneistoffen (Zeilen 1-4 [Vieth et al., 2004]) und des Prodrugs 1331.

	MW	ClogP (Da)	PSA (Å ²)	Anzahl Atome (≠ H)	Anzahl Os und Ns	Anzahl OH und NH	Anzahl Halogenatome
0-100 %	74-1449	(-7,6)-20,2	0-447	4-101	0-33	0-18	0-18
5-95 %	164-589	(-1,9)-6,3	13-169	11-41	2-12	0-4	0-2
10-90 %	200-475	(-0,8)-5,2	22-134	14-33	2-9	0-3	0-2
Mittelwert	343,7	2,3	78	23,9	5,5	1,8	0,5
1331	554	0,8	195	39	12	5	0

Die Werte für Inhibitor **1331** wurden mit der Software SAR Navigator, Version 1.5 (Tripos), berechnet. Die gelben Felder kennzeichnen die Bereiche, denen die Verbindung **1331** zugeordnet werden kann.

Untersuchungen mit den Prodrugs **1715** und **1331** haben gezeigt, dass die synthetisierten Verbindungen an der Ratte nur in geringen Mengen oral aufgenommen werden, sofern die Amidinofunktion als Hydroxyamidin geschützt vorliegt (*Abb. 55 und Abb. 56*). Als Referenzsubstanz wurde Ximelagatran, das oral verfügbare doppelte Prodrug des Thrombinhemmstoffs Melagatran, verwendet [Gustafsson *et al.*, 2001]. Ximelagatran wird zu ca. 40-70 % oral resorbiert. Allerdings werden große Mengen des doppelten Prodrugs oder der Mono-Prodrugs, die nur unvollständig in die Wirksubstanz Melagatran überführt wurden, direkt ausgeschieden. Daher ergibt sich aufgrund der bestimmten Plasmaspiegel des Melagatrans nur eine orale Bioverfügbarkeit des Ximelagatrans von etwa 20 % am Menschen und 5-10 % an der Ratte [Eriksson *et al.*, 2003]. Aus diesem Grund ist es von Vorteil, wenn möglichst wenige oder gar keine funktionellen Gruppen im Inhibitor als Prodrug vorliegen.

Während der Resorptionsexperimente an der Ratte wurden starke Schwankungen in den Plasmaspiegeln der Einzelversuche beobachtet (*Abb. 55 und Abb. 56*), wodurch der Vergleich mit Ximelagatran erschwert wird. Bei den Versuchen mit dem Prodrug **1331** wurden neben zwei Experimenten, die eine eher geringe duodenale Resorption zeigen, in zwei Fällen auch signifikant erhöhte Plasmaspiegel von etwa 1 µg/ml bestimmt, die mit Ximelagatran bzw. Melagatran vergleichbar sind (*Abb. 56*). Die Ursachen der starken Schwankungen sind nicht bekannt, könnten aber durchaus in inter-individuell bedingten Verträglichkeitsunterschieden bei den Versuchstieren liegen. Zudem ist bekannt, dass auch Melagatran nach oraler Applikation an Ratten deutliche Streuungen zeigt [Eriksson *et al.*, 2003].

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Rattenmodell für orale Resorptionsversuche nur bedingt geeignet ist und weitere Untersuchungen an anderen Spezies durchgeführt werden sollten.

Metabolisierung und mutagenes Potential

Systematische Untersuchungen zum Metabolismus der beschriebenen Verbindungen wurden nicht durchgeführt. Allerdings wurde im Rahmen der Eliminationsstudien an der Ratte auch die Ausscheidung der unveränderten Inhibitoren in Galle und Urin durch HPLC-Analyse in Kombination mit Messung ihrer Hemmaktivität bestimmt. In den meisten Fällen wurden über einen Zeitraum von 6 h insgesamt ca. 60-80 % der aktiven Wirksubstanz nachgewiesen. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass eine Metabolisierung, die zur Inaktivierung der Hemmstoffe führt, nur in geringem Umfang stattfindet. Auffallend ist jedoch, dass bei Untersuchung der Inhibitoren mit einer anilinischen Aminofunktion (z.B. **760**) deutlich weniger Wirksubstanz in Galle und Urin nachweisbar war (< 40 %), was möglicherweise auf eine stärkere Metabolisierung dieser Substanzen hinweist.

Arzneimittel müssen wirksam und gut verträglich sein, aber auch ohne toxische Nebenprodukte im Körper metabolisiert und ausgeschieden werden. Um das mögliche mutagene Potential von Wirkstoffen zu bestimmen, wird zu Beginn der präklinischen Entwicklung in der Regel ein Ames-Test durchgeführt [Ames *et al.*, 1975; Maron u. Ames, 1983]. Dabei werden Bakterienstämme mit der entsprechenden Substanz inkubiert und hinsichtlich auftretender Mutationen untersucht. Im Falle der Verbindung **760** (Tab. 8) ergab dieser Ames-Test, dass der Inhibitor sowohl mutagene als auch zytotoxische Effekte auslöst. Im Gegensatz dazu wurde für den strukturell ähnlichen uPA-Hemmstoff BzIs-D-Ser-Ser-4-Amidinobenzylamid mit unsubstituiertem P4-Rest kein mutagenes Potential festgestellt. Es ist bekannt, dass durch eine N-Hydroxylierung aromatischer Amine Zwischenprodukte bzw. Metaboliten mit toxischen und/oder karzinogenen Eigenschaften entstehen können [Clement *et al.*, 1997]. Dies lässt vermuten, dass möglicherweise die anilinische Aminogruppe des Inhibitors **760** Ursache für deren mutagenen Effekt ist. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Inhibitoren mit diesem Substituenten synthetisiert.

3.4.4. Gerinnungshemmende Wirksamkeit

Die IC₂₀₀-Werte für die Hemmung der aPTT und PT dienten im Rahmen dieser Arbeit zur Bestimmung der tatsächlichen antikoagulativen Wirksamkeit der Inhibitoren *in vitro*. In den meisten Fällen korrelieren die Ergebnisse aus den Gerinnungstests mit den K_i-Werten für die Hemmung des FXa durch die untersuchten Substanzen. Allerdings können auch Verbindungen, die eine hohe FXa-Hemmwirkung aufweisen, im aPTT- und PT-Test nahezu unwirksam sein, wenn sie beispielsweise eine starke Tendenz zur unspezifischen Plasmaproteinbindung besitzen. Der zu Vergleichszwecken untersuchte Inhibitor DX-9065a

zeigt eine deutlich geringere Wirksamkeit auf die IC₂₀₀-Werte der aPTT- und PT-Messungen als viele der in dieser Arbeit beschriebenen Verbindungen. Der zum Vergleich aufgeführte Thrombinhemmstoff Melagatran bewirkt ebenfalls eine starke Gerinnungshemmung (Tab. 24). Die gute Korrelation zwischen den FXa-Hemmkonstanten und der antikoagulativen Wirksamkeit *in vitro* lässt vermuten, dass die untersuchten FXa-Inhibitoren keine starke Plasmaproteinbindung besitzen und theoretisch als Antikoagulantien geeignet sind. Bei der Untersuchung der *in vivo*-Wirksamkeit im Thrombosemodell nach Wessler korrelierte die Wirkung der Inhibitoren nicht in jedem Fall mit den Ergebnissen aus dem aPTT- und PT-Assay. Von den untersuchten Substanzen mit IC₂₀₀-Werten < 1,0 µM für aPTT und PT in humanem Plasma *in vitro* (Tab. 24) sind nur vier Hemmstoffe im Wessler-Modell an der Ratte antithrombotisch wirksam und nur zwei davon besitzen einen mit Melagatran vergleichbaren ED₅₀-Wert (Tab. 25).

Es ist bekannt, dass sich der FXa von Ratten offenbar deutlich von humanem FXa unterscheidet. Daher gibt es in vielen Fällen nur eine schwache Korrelation der Wirkung von FXa-Hemmstoffen in Ratten- und humanem Plasma; oftmals ist die Wirksamkeit der Hemmstoffe in Rattenplasma deutlich reduziert [Otto, 2003]. Dies könnte erklären, dass, im Gegensatz zu Thrombinhemmstoffen wie Melagatran, nur die wirksamsten FXa-Inhibitoren, wie z.B. **1332**, im Wessler-Modell an der Ratte einen antithrombotischen Effekt zeigen.

Bei der Beurteilung der Aktivität von FXa-Inhibitoren muss beachtet werden, dass niedrige Hemmkonstanten nicht immer gleichbedeutend mit einer starken gerinnungshemmenden Wirksamkeit sind. In vielen Fällen gibt es deutliche Unterschiede zwischen den Ergebnissen von *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen. Viele der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Hemmstoffe sind *in vitro* und *in vivo* deutlich wirksamer als die Referenzverbindung DX-9065a und vergleichbar mit dem Thrombinhemmstoff Melagatran.

Trotz der hervorragenden gerinnungshemmenden Aktivität dieser Inhibitoren sind weitere Optimierungen notwendig, um deren orale Bioverfügbarkeit zu verbessern.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Thromboembolische und Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehören zu den häufigsten Krankheitsfällen und Todesursachen in Westeuropa und Nordamerika. Die Entwicklung von wirksamen und sicheren Antikoagulantien, die ergänzend und anstelle der bisherigen Standardtherapeutika zur Behandlung thromboembolischer Erkrankungen eingesetzt werden können, ist weltweit ein aktuelles Forschungsziel vieler Firmen und Gruppen. Dabei ist, neben Thrombin, auch der Gerinnungsfaktor Xa ein wichtiges Zielenzym, das entscheidend an der Regulierung der Blutgerinnung beteiligt ist. Es gibt zahlreiche Hinweise, dass die selektive Hemmung von FXa weniger Nachteile und Nebenwirkungen hat, als beispielsweise die Anwendung von Cumarinen und Heparinen. Studien mit den Pentasacchariden Fondaparinux und Idraparinux, sowie mit den natürlich vorkommenden peptidischen FXa-Inhibitoren Antistasin und TAP haben bestätigt, dass die Anwendung dieser Substanzen im Vergleich zur klassischen Standardtherapie zu weniger Blutungskomplikationen führt. In den letzten Jahren sind viele synthetische niedermolekulare FXa-Inhibitoren entwickelt worden und einige oral wirksame Verbindungen, wie z.B. Razaxaban oder BAY 59-7939, befinden sich zur Zeit in der klinischen Entwicklung (Phase II). Bislang ist jedoch kein oral bioverfügbarer Hemmstoff des FXa als Arzneimittel zugelassen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Grundstrukturen bereits bekannter Inhibitoren optimiert werden, um eine Verbesserung der Affinität, verbunden mit einer verzögerten Eliminierung aus der Zirkulation im Tiermodell an der Ratte zu erreichen. Idealerweise sollten die Verbindungen auch oral aufgenommen werden.

Durch gezielte Substitution der P3-Aminosäure ist es gelungen, mehrere wirksame und selektive Substrat-analoge FXa-Hemmstoffe mit D-Homophenylalanin und anderen aromatischen Homoaminosäuren in P3-Position zu entwickeln. Dagegen konnte nur in wenigen Fällen ein verzögertes Eliminationsverhalten erreicht werden. Aufgrund der einfacheren chemischen Zugänglichkeit wurden zur Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen auch einige Inhibitoren mit D-Phe in P3-Position synthetisiert, diese sind verglichen mit den D-hPhe-Analoga jedoch deutlich weniger wirksam. Das *Modeling* der Verbindung **802** im Komplex mit FXa hat gezeigt, dass der aromatische Ring des P3-D-hPhe aufgrund der zusätzlichen Methylengruppe in der Seitenkette optimal in der Aryl-Bindungstasche lokalisiert ist. Zusätzlich wird die Bindung des Inhibitors durch mehrere vom Rückgrat ausgehende Wasserstoffbrücken zum Enzym stabilisiert.

Ausgehend von Inhibitor **802** (Bzls-D-hPhe-Gly-4-Amidinobenzylamid, $K_i = 6,0$ nM) wurden die Hemmstoffe **740** (Bzls-D,L-hAla(4-Pyr)-Gly-4-Amidinobenzylamid, $K_i = 7,1$ nM) und **745** (Bzls-D-hTyr-Gly-4-Amidinobenzylamid, $K_i = 3,0$ nM) synthetisiert, die eine vergleichbar starke Hemmwirkung gegenüber FXa besitzen. Zur genaueren Untersuchung der Homopyridylalanin-Inhibitoren wurden zusätzlich die Verbindungen **1705** (Bzls-D,L-hAla(3-Pyr)-Gly-4-Amidinobenzylamid, $K_i = 4,0$ nM) und **1707** (Bzls-D,L-hAla(2-Pyr)-Gly-4-Amidinobenzylamid, $K_i = 0,83$ nM) hergestellt. Dabei zeigt sich eine signifikant (> 5 -fach) erhöhte anti-FXa-Aktivität der D,L-2-Homopyridylalanin-Verbindung **1707** im Vergleich zu den Pyridyl-Derivaten, bei denen sich der Stickstoff in *meta*- oder *para*-Stellung befindet.

Die durchgeführten Variationen an P4- und P2-Resten in Kombination mit D-hPhe, D-hTyr und D,L-hAla(Pyr) haben zu Inhibitoren mit sehr unterschiedlichen Hemmkonstanten geführt. Eine Substitution des P4-Rings mit Carboxymethyl- oder Nitrogruppen sowie Pyridylringen bewirkte in den meisten Fällen einen Affinitätsverlust, lediglich der Einbau einer Aminogruppe in *para*-Position am P4-Ring führte zu einer leichten Verstärkung der FXa-Hemmwirkung. Allerdings wurden bei Untersuchung des P4-Amino-substituierten Inhibitors **760** im Ames-Test mutagene und zytotoxische Effekte beobachtet, die möglicherweise auf die anilinische Aminofunktion zurückzuführen sind. Deshalb wurde bei der weiteren Optimierung der Inhibitoren auf den Einbau des 4-Aminobenzylsulfonylestes in P4-Position verzichtet.

Daneben zeigte sich bezüglich Affinität und Selektivität eine deutliche Präferenz des FXa für Gly als P2-Rest; der Einbau anderer Aminosäuren führte zu weniger wirksamen Inhibitoren mit geringerer Selektivität. Eine gezielte Veränderung der 4-Amidinobenzylamid-Gruppe in P1-Position wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Um die schnelle Eliminierung der Hemmstoffe im Tierversuch zu reduzieren, wurde der Stickstoff der P4- und P3-Pyridylringe zu den entsprechenden N-Oxiden oxidiert. Diese Modifizierungen bewirkten am P4-Ring in allen Fällen einen starken Affinitätsverlust. Im Gegensatz dazu führte der Einbau des 2-Homopyridylalanin-N-Oxids in P3-Position zu einem Inhibitor mit starker FXa-Hemmwirkung, exzellenter Selektivität und einer deutlich verzögerten Eliminationsgeschwindigkeit an der Ratte nach *i.v.*-Gabe. Da aus früheren Synthesen bekannt war, dass FXa in P3-Position Aminosäuren in der D-Konfiguration bevorzugt, wurden die D,L-Homopyridylalanine zur Racemattrennung in die entsprechenden Benzoyl-Aminosäure-Methylester überführt. Die Enantiomere konnten nach Chymotrypsin-katalysierter Spaltung des Methylesters der Benzoyl-L-Aminosäure und saurer Hydrolyse mittels Ionenaustauschchromatographie getrennt werden. Es zeigten sich allerdings Verunreinigungen (ca. 5 %) mit dem jeweils anderen Enantiomer; deshalb muss die Racemattrennung weiter optimiert

werden. Im Anschluss an die Racemattrennung wurden die Inhibitoren mit den D-Homopyridylalaninen und D-Homopyridylalanin-N-Oxiden in P3-Position synthetisiert und deren Hemmkonstanten und Eliminationskinetik bestimmt sowie gerinnungsphysiologische Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* durchgeführt. Gegenüber den racemischen Inhibitoren sind deren D-Derivate - wie erwartet - inhibitorisch etwa doppelt so aktiv. Der Hemmstoff **1332** mit D-2-Homopyridylalanin-N-Oxid ist mit einem K_i -Wert von 0,32 nM der wirksamste aller bis dahin untersuchten FXa-Inhibitoren dieses Strukturtyps und wurde deshalb als Leitsubstanz für weiterführende *in vivo*-Untersuchungen ausgewählt. Obwohl der Hemmstoff **1332** im Vergleich zum racemischen Inhibitor **1215** schneller eliminiert wird, zeigt sich in allen anderen Untersuchungen eine erhöhte Wirksamkeit im Vergleich zum Racemat. Neben den verbesserten K_i -Werten ist der Inhibitor **1332** auch im aPTT- und PT-Test etwa doppelt so aktiv. Der ED_{50} -Wert der antithrombotischen Wirksamkeit *in vivo* wurde ebenfalls deutlich verbessert. Zur weiteren Charakterisierung wurde die Hemmwirkung ausgewählter Substanzen auf die Thrombinbildung bestimmt. Bei diesen Untersuchungen zeigt Inhibitor **1332** selbst in Konzentrationen von $\leq 0,1 \mu\text{M}$ einen starken Effekt und kann die Bildung der Prothrombinfragmente F1+F2 in Kaolin- bzw. *Tissue Factor*-aktiviertem Plasma zu mehr als 99 % verhindern.

Aufgrund der positiv geladenen 4-Amidinobenzylamidfunktion in P1-Position besitzen die Hemmstoffe keine orale Bioverfügbarkeit. Erst nach Umwandlung in ein Hydroxyamidin wird die geladene Amidinogruppe so maskiert, dass die resultierenden Prodrugs der Inhibitoren, wenn auch in geringen Mengen und mit großen Schwankungen, bei Versuchen an Ratten nach oraler bzw. duodенaler Applikation resorbiert werden. Erste Versuche zur Resorption Prodrug-geschützter Inhibitoren wurden schon mit der Verbindung **771** (Bzls-D-hTyr-Glu(OEt)-4-Hydroxyamidinobenzylamid) durchgeführt. Die Versuche ergaben jedoch nur eine sehr geringe Aufnahme des Prodrugs nach oraler bzw. duodенaler Gabe an der Ratte. Dabei wurde gezeigt, dass im Rattenplasma sowohl der Ethylester schnell und nahezu quantitativ hydrolysiert wird, als auch die Umwandlung des Hydroxyamidins in das freie Amidin relativ rasch stattfindet.

Um die orale Aufnahme des Inhibitors **1332** zu erhöhen, wurde dessen Hydroxyamidino-Prodrug **1331** synthetisiert. Während der Resorptionsversuche mit dem Prodrug **1331** an der Ratte traten ungewöhnlich starke Schwankungen in den für Inhibitor **1332** gemessenen Blutspiegeln auf. Dadurch wurde die exakte Auswertung und der Vergleich mit der Referenzverbindung Ximelagatran erschwert. In einigen Fällen sind die erhaltenen

Plasmaspiegel nach oraler bzw. duodенaler Applikation der Verbindung **1331** jedoch mit denen des Thrombinhemmstoffs Ximelagatran vergleichbar. Mit der Leitsubstanz **1332** bzw. deren Prodrug **1331** werden zur Zeit Resorptionsversuche an Schweinen durchgeführt, die eine genauere Aussage über die orale Aufnahme an einer weiteren Spezies liefern sollen.

Obwohl mit den vorgestellten FXa-Hemmstoffen ein deutlicher Fortschritt gegenüber den bereits bekannten Verbindungen dieses Strukturtyps erzielt werden konnte und Inhibitor **1332** mit einem K_i -Wert von 0,32 nM zu den wirksamsten bisher beschriebenen FXa-Hemmstoffen gehört, sind weitere Optimierungen unerlässlich. Dabei soll vor allem untersucht werden, ob der 4-Amidinobenzylamidrest in P1-Position durch neutrale oder weniger stark basische Gruppen austauschbar ist. Solche Reste wurden bereits von mehreren Gruppen beschrieben und sollen eine Möglichkeit sein, um Inhibitoren auch ohne Prodrug-Schutz oral bioverfügbar zu machen. Erste Substitutionsversuche mit weniger geladenen Resten hatten zwar einen Affinitätsverlust zur Folge, es wurden aber auch Inhibitoren mit K_i -Werten < 10 nM gefunden. Allerdings zeigen diese Verbindungen in der Regel eine rasche Elimination aus der Zirkulation von Ratten. Neben diesen Variationen der P1-Position sind weitere Modifikationen am P4-Rest geplant. Dabei soll unter Erhaltung der Affinität, Selektivität und Eliminationskinetik das Molekulargewicht der Inhibitoren reduziert werden. Erste Ergebnisse mit Alkylsulfonylresten haben gezeigt, dass trotz verminderter Wirksamkeit immer noch Hemmstoffe mit K_i -Werten im nanomolaren Bereich erhalten werden können (Tab. 27). Dabei zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit der FXa-Hemmwirkung von der Kettenlänge des Alkylsulfonylrestes; die Affinität steigt mit der Anzahl der Kohlenstoffatome.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden stark wirksame und sehr selektive Inhibitoren des FXa entwickelt und synthetisiert, wobei insbesondere die Verbindungen mit Homopyridylalanin-N-Oxiden in P3-Position relativ langsam eliminiert werden. Die wirksamsten Inhibitoren, wie z.B. **1332** und **1730** zeigen bei Untersuchungen *in vitro* bei der Bestimmung der aPTT und PT sowie *in vivo* im Thrombosemodell nach Wessler sehr starke gerinnungshemmende Effekte. Dennoch müssen die Substanzen weiter optimiert werden, um ihre orale Bioverfügbarkeit zu verbessern. Nur ein oral wirksamer FXa-Hemmstoff kann eine echte Alternative zu den bisher gebräuchlichen Antikoagulantien sein.

5. Experimenteller Teil

5.1. Materialien und Methoden zur Synthese und analytischen Charakterisierung

Verwendete Materialien

Die verwendeten Lösungsmittel wurden von den Firmen Acros, Aldrich, Fluka, Fisher, Merck und Roth bezogen. Dabei handelte es sich um Lösungsmittel in p.a.- oder HPLC-*grade* Qualität. Das verwendete DMF hatte die Bezeichnung „zur Peptidsynthese“. Trockene Lösungsmittel wurden durch Lagerung über geeignetem Molsieb hergestellt. Für die analytische und präparative HPLC wurde Acetonitril der Firmen Merck (LiChrosolv) und Fisher (*Gradient-grade*) sowie Reinstwasser verwendet. Sämtliche Standardchemikalien wurden ebenfalls von den Firmen Acros, Aldrich, Fluka, Fisher, Merck und Roth bezogen, bei Ausnahmen ist der Hersteller gesondert angegeben. Wässrige Lösungen von Säuren, Basen oder Salzen wurden mit Reinstwasser hergestellt. Die meisten Aminosäuren, deren Derivate sowie Kopplungsreagenzien stammen, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Bachem und Novabiochem.

Analytische HPLC

Zur analytischen *reversed-phase* (RP-) HPLC wurde eine HPLC-Anlage LC-10A der Firma Shimadzu, bestehend aus den Teilsystemen *CTO-10AS* Säulenofen, *LC-10AD* Pumpen (2 x), *DGU-14A* Degaser, *SIL-10AD* Autoinjektor, *SCL-10A* Systemcontroller, *SPD-10A* UV-Vis Detektor und einer Säule Luna 5 μm C18(2) 100 Å, 250 x 4,6 mm der Firma Phenomenex, unter Benutzung der zugehörigen Software Shimadzu CLASS-VP, Version 5.3, verwendet. Die Detektion erfolgte bei 220 nm. Als Elutionsmittel dienen Wasser mit 0,1 % TFA (A) und Acetonitril mit 0,1 % TFA (B) bei einer Flussrate von 1 ml/min und einem linearen Gradienten (1 % B/min) bei unterschiedlichen Startbedingungen (1, 10, 20, 30 oder 40 % B).

Präparative HPLC

Zur präparativen RP-HPLC wurde ebenfalls eine HPLC-Anlage der Firma Shimadzu, bestehend aus den Teilsystemen *LC-8A* präparative Pumpen (2 x), *DGU-14A* Degaser, *FRC-10A* Fraktionssammler, *SCL-10A* Systemcontroller, *SPD-10A* UV-Vis Detektor und einer Säule Luna 5 μm C8(2) 100 Å, 250 x 30,0 mm der Firma Phenomenex, unter Benutzung der zugehörigen Software Shimadzu CLASS-VP, Version 5.3, verwendet. Die Detektion erfolgte bei 220 nm. Als Elutionsmittel dienen ebenfalls Wasser mit 0,1 % TFA (A) und Acetonitril mit 0,1 % TFA (B) bei einer Flussrate von 10 oder 20 ml/min und einem geeigneten Gradienten.

Ionenaustauschchromatographie

Zur Reinigung der Inhibitoren wurde eine ÄKT*Aprime*-Anlage der Firma Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Als Trennmateriale wurde Fractogel[®] EMD COO⁻ Kationenaustauscher (800 Å) in einer Säule XK 16 (16 x 130 mm) eingesetzt. Als Elutionsmittel dienten Wasser (A) und 1 M Ammoniumacetatlösung (B) bei einer Flussrate von 5 ml/min und einem linearen Gradienten.

Alternativ wurde zur Reinigung von Aminosäuren der saure Ionenaustauscher Dowex[®] 50WX8-200 in der Ammoniumform eingesetzt (Säulengröße 10 x 15 cm). Die Elution erfolgte manuell mit 0,2 N Ammoniaklösung.

Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-Fertigplatten Adamant UV₂₅₄ der Firma Macherey-Nagel verwendet. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus *n*-Butanol, Eisessig und Wasser (4:1:1). Die Detektion der Verbindungen erfolgte durch UV-Absorption bei 254 nm, außerdem wurden als Sprühreagenzien eine Ninhydrinlösung (300 mg Ninhydrin gelöst in 100 ml *n*-Butanol und 3 ml Eisessig) und nach Inkubation der DC-Platte in Chloratmosphäre eine *o*-Tolidinlösung (150 mg *o*-Tolidin und 2,1 g KI gelöst in 2 ml Eisessig und 148 ml Wasser) verwendet.

Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden mit einem ESI-MS LCQ Spektrometer (mit Ionenfallendetektor) der Firma Thermo Electron am Hans-Knöll-Institut (HKI), Jena, aufgenommen. Dazu wurden die Proben in Methanol gelöst.

NMR-Spektrometrie

Die NMR-Spektren wurden mit einem Bruker Avance DPX 300 Spektrometer am Institut für Hans-Knöll-Institut (HKI), Jena aufgenommen. Dazu wurden die Proben wenn möglich in D₂O, ansonsten in Chloroform-*d* (CDCl₃) gelöst. Die chemischen Verschiebungen wurden in ppm angegeben und sind auf die Lösungsmittelsignale bezogen.

5.2. Enzymkinetische Messungen

Die im Folgenden aufgeführten enzymkinetischen und pharmakokinetischen Untersuchungen wurden im Institut für vaskuläre Medizin der FSU Jena in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Stürzebecher durchgeführt.

5.2.1. Bestimmung der Hemmkonstanten

Die Hemmkonstanten (K_i -Werte) für verschiedene Enzyme wurden unter Verwendung spezifischer synthetischer chromogener Substrate ermittelt. Die Absorption wurde bei 405 nm mit einem *Microplate Reader* (iEMS Reader MF 1401, LABSYSTEMS, Helsinki, Finnland) bestimmt und die Berechnung der K_i -Werte erfolgte mit Hilfe eines Computerprogramms durch lineare Regression nach Dixon [Dixon, 1953].

Die Bestimmung erfolgte in Tris-Puffer (0,05 M Tris; 0,9 % NaCl; 5 % Ethanol; pH 8,0) auf Mikrotiter-Platten bei 25 °C. Der Inhibitor wurde in Tris-Puffer gelöst, die Substrate (alle Pentapharm Ltd., Basel, CH) in Wasser. Zu 200 µl Inhibitorlösung wurden 25 µl Substratlösung und 50 µl Enzymlösung zugegeben und die Reaktion nach 3-5 min durch Zugabe von 25 µl 50 % Essigsäure abgebrochen [Stürzebecher *et al.*, 1997]. Diese Bestimmungsmethode ist für K_i -Werte unter 2,0 nM nicht geeignet, daher wurde in solchen Fällen die Messung bei reduzierter Enzymkonzentration (für FXa: 100 pM) in Acrylküvetten an einem UV/Vis-Spektralphotometer Specord M 400 (Carl Zeiss, Jena) wiederholt. Es wurden jeweils drei verschiedene Substrat- und fünf verschiedene Inhibitorkonzentrationen gemessen. Die errechneten K_i -Werte entsprechen den Mittelwerten aus mindestens zwei Einzelbestimmungen, deren Einzelwerte nicht mehr als 25 % voneinander abweichen.

Faktor Xa (FXa) (human) (Enzyme Research Lab., bezogen von Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen)

Enzymgehalt: 0,67 µg/ml

Substrat: CH₃OCO-D-Cha-Gly-Arg-pNA (Pefachrome Xa), Konzentration: 4; 2 und 1 mM;

Reaktionszeit: 4 min

Thrombin (bovin) (Herstellung nach [Walsmann u. Markwardt, 1981])

Enzymgehalt: 2,5 IE/ml (in 0,9 % NaCl mit 1 % HSA)

Substrat: CH₃SO₂-D-HHT-Gly-Arg-pNA (Pefachrome tPA), Konzentration: 2; 1 und 0,5 mM;

Reaktionszeit: 3 min

Trypsin (bovin) (Serva Feinbiochemika GmbH & Co., Heidelberg)

Enzymgehalt: 0,5 µg/ml (in 1 mM HCl)

Substrat: CH₃SO₂-D-HHT-Gly-Arg-pNA (Pefachrome tPA), Konzentration: 2; 0,67 und 0,5 mM; Reaktionszeit: 4 min

Plasmin (human) (CHROMOGENIX, Milano, Italien)

Enzymgehalt: 500 µg/ml Enzym (in 0,9 % NaCl mit 25 % Glycerol)

Substrat: Tos-Gly-Pro-Lys-pNA (Chromozym PL), Konzentration: 2; 1 und 0,67 mM; Reaktionszeit: 3 min

Urokinase (uPA) (human) (rheothromb[®], CURASAN AG, Kleinostheim)

Enzymgehalt: 0,1 mg/ml Enzym (ca. 850 IE/ml in 0,9 % NaCl)

Substrat: Bz-β-Ala-Gly-Arg-pNA (Pefachrome UK) Konzentration: 2; 1 und 0,5 mM; Reaktionszeit: 5 min

Zur genaueren Charakterisierung der Selektivität ausgewählter Hemmstoffe wurden weitere Enzyme nach der gleichen enzymkinetischen Methode untersucht [Stürzebecher *et al.*, 1997]:

Tissue-type Plasminogenaktivator (tPA) (human) (Boehringer Mannheim, Penzberg)

Substrat: CH₃SO₂-D-HHT-Gly-Arg-pNA (Pefachrome tPA)

Faktor VIIa (rekombinant human) (Novo Nordisk Pharma GmbH, Mainz),

Substrat: CH₃SO₂-D-Phe-Gly-Arg-pNA (Chromozym tPA)

Faktor XIIIa (human) (Enzyme Research Lab., s.o.)

Substrat: H-D-HHT-Gly-Arg-pNA (Chromozym XII)

Faktor XIa (human) (Enzyme Research Lab., s.o.)

Substrat: H-D-Lys(Cbz)-Pro-Arg-pNA (Chromozym PCa)

Plasmakallikrein (human) (Enzyme Research Lab., s.o.)

Substrat: Bz-Pro-Phe-Arg-pNA (Chromozym PK)

Protein Ca (human) (Kordia Laboratory Supplies Leiden, Niederlande)

Substrat: H-D-Lys(Cbz)-Pro-Arg-pNA (Chromozym PCa)

Trypsase (rekombinant human) (Promega, Madison, WI, USA)

Substrat: Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (Chromozym TH)

5.2.2. Hemmung des Prothrombinasekomplexes

Die IC_{50} -Werte für die Hemmung des Prothrombinasekomplexes wurden unter Verwendung eines spezifischen chromogenen Substrates ermittelt. Die Bestimmung der Absorption erfolgte mit einem *Microplate Reader* (siehe oben) bei 405 nm und 37 °C.

Die Herstellung des Prothrombinasekomplexes erfolgte durch vorsichtiges Mischen von 250 µl Cephalin (Cephalin-Lyophilisat aus PTT-Reagenz, Roche Diagnostics, Mannheim; gelöst in 5 ml Tris-Puffer A (0,05 M Tris; 0,9 % NaCl; pH 7,5)), 50 µl 0,5 M $CaCl_2$, 25 µl Faktor Xa (human, Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen; 0,16 µg/ml), 80 µl Faktor Va (human, American Diagnostica, Greenwich, USA; 52 µg/ml) und 1845 µl Tris-Puffer B (0,05 M Tris; 0,9 % NaCl; 0,1 % PEG 6000; pH 7,5) auf Eis und anschließende Inkubation für 30 min bei 0 °C. Der Inhibitor wurde in Tris-Puffer B mit 5 % Ethanol gelöst. 25 µl Inhibitorlösung wurden mit 45 µl Prothrombinasekomplex für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 30 µl Prothrombin (human, Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen; 29 µg/ml) zugegeben, nach 10 min Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 µl 0,083 mM EDTA in Puffer B abgestoppt.

Die Aktivität des gebildeten Thrombins wurde nach Zugabe von 50 µl Substrat (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA x HCl, S-2238, Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen; 0,6 mM) und 200 µl EDTA in Tris-Puffer B zu 25 µl des Inkubationsansatzes chromogen bestimmt.

Der IC_{50} -Wert, d.h. die Inhibitorkonzentration, die eine 50 %ige Hemmung der Thrombinbildung verursacht, wurde graphisch bestimmt. Um zu verhindern, dass durch direkte Thrombinhemmung eine Hemmung des Prothrombinasekomplexes vorgetäuscht wird, wurde auch die direkte Hemmung des generierten Thrombins gemessen (durch Zugabe von 25 µl Tris-Puffer B mit der höchsten Inhibitorkonzentration nach Abstoppen durch EDTA). Bei einer direkten Hemmung des gebildeten Thrombins von > 7 % wurde kein IC_{50} -Wert angegeben. Es wurden jeweils fünf verschiedene Inhibitorkonzentrationen gemessen. Die errechneten IC_{50} -Werte entsprechen den Mittelwerten aus mindestens drei Einzelbestimmungen, deren Einzelwerte nicht mehr als 25 % voneinander abweichen.

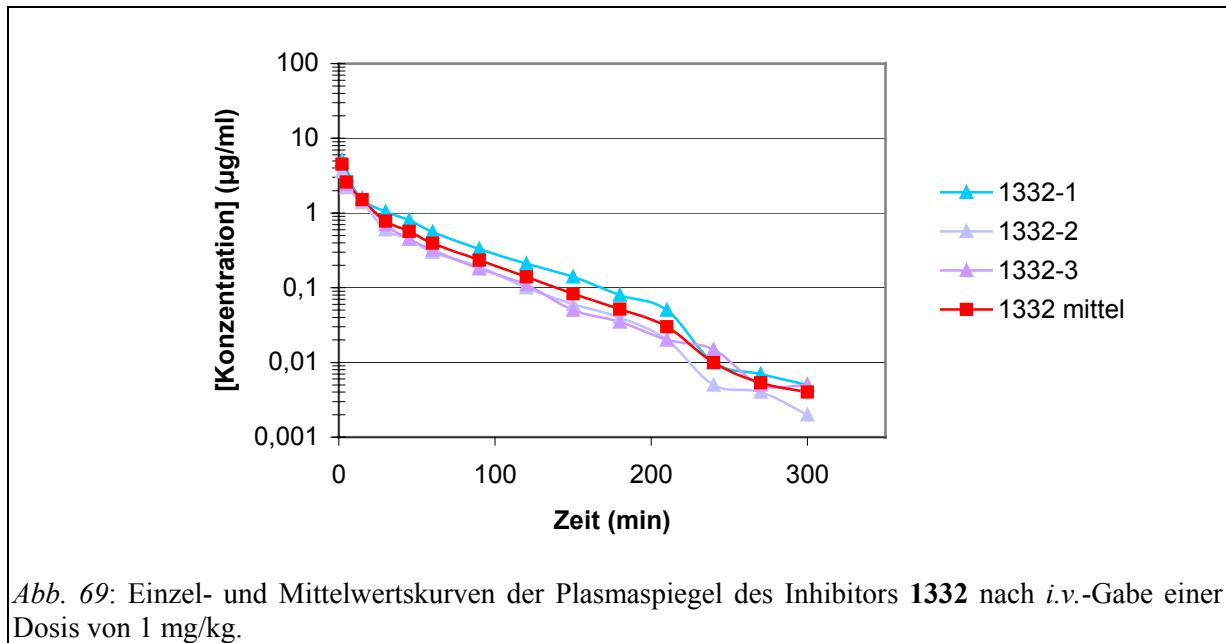
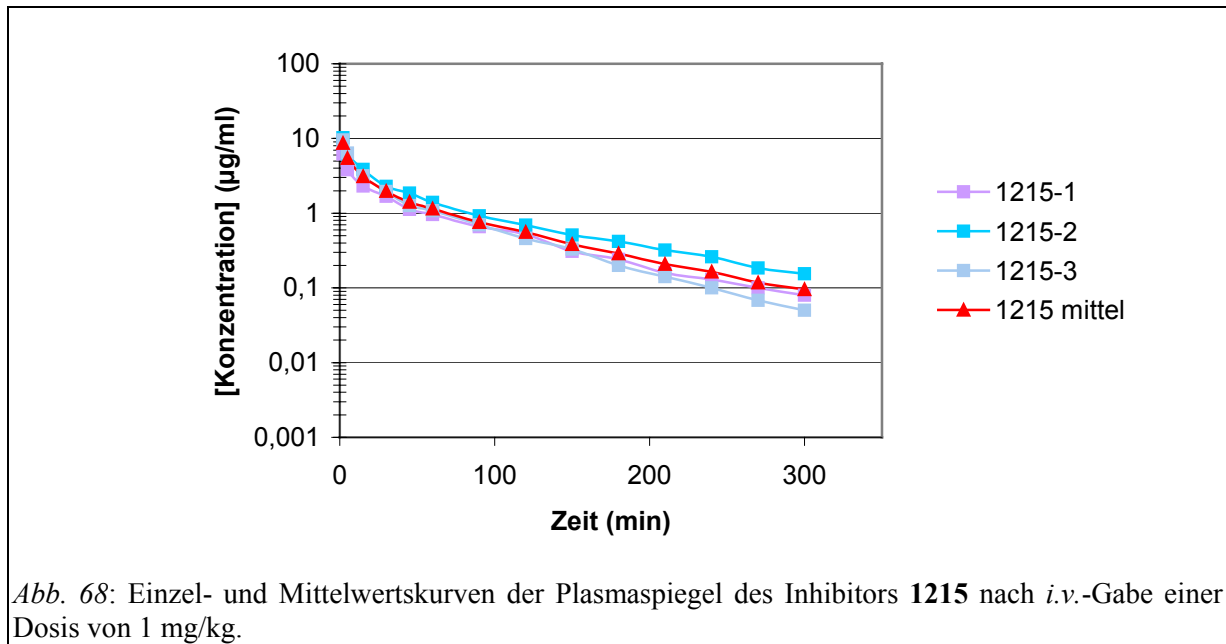
5.3. Hemmung der Thrombinbildung

Die Bestimmung der Konzentration der gebildeten Prothrombinfragmente F1 und F2 erfolgte durch einen Immunoassay (Enzygnost[®] F 1+2 micro, Dade Behring, Marburg) mit chromogenem Substrat und anschließender Messung der Absorption bei 492 nm mit einem *Microplate Reader* (siehe oben) [Pelzer *et al.*, 1991].

Vor dem Versuch wurden 9 Teile Blut mit 1 Teil Hirudin (HBW 023 rekombinant, 13442 TIE/mg, Hoechst, Frankfurt (1995); 2000 E/ml 0,9 % NaCl) versetzt und bei RT für 10 min bei 1300 U/min zentrifugiert. Das Hirudinplasma wurde für jeden Versuch frisch hergestellt. 900 µl Hirudinplasma wurden in genormten Polypropylen-Gefäßen mit 50 µl Inhibitorlösung in 0,9 % NaCl und 50 µl Aktivator (Kaolin, aus PTT-Test von Roche Diagnostics, 1 : 250 verdünnt mit 0,9 % NaCl) versetzt und bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Zu bestimmten Zeiten – 0, 1, 2, 3, 4, 5 h – wurden 150 µl abgenommen, mit 10 µl 0,1 M EDTA-Lösung versetzt und gut gemischt. Die erhaltenen Proben wurden sofort bei -20 °C tiefgefroren. Für die nicht-aktivierte Kontrolle wurden statt Inhibitorlösung und Kaolin 100 µl 0,9 % NaCl zugegeben, die 100 %-Kontrolle enthielt 50 µl 0,9 % NaCl statt der Inhibitorlösung und 50 µl Aktivator (Kaolin, aus PTT-Test von Roche Diagnostics, 1 : 50 verdünnt mit 0,9 % NaCl).

5.4. Pharmakokinetische Untersuchungen

Für die Bestimmung der Eliminationskinetiken wurden weibliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 270 bis 320 g eingesetzt. Die Ratte wurde mit 1,25 g/kg Körpergewicht *i.p.* Ethylurethan narkotisiert. Die am Hals gelegene *Arteria carotis* wurde freipräpariert und es wurde ein Katheter eingebracht und fixiert. Zur Applikation wurde eine Lösung der entsprechenden Inhibitoren in 0,5 ml einer 0,9 % NaCl-Lösung (enthielt bei Bedarf 5 % Ethanol) hergestellt und steril filtriert. Die Dosierung betrug bei *i.v.*-Gabe jeweils 1 mg/kg Körpergewicht und bei oraler bzw. duodenaler Gabe 5 mg/kg. Es wurden jeweils 500 µl Blut aus der katheterisierten *Arteria carotis* entnommen und im Verhältnis 1:10 mit 3,8 % Natriumcitratlösung versetzt. Der dabei entstandene Blutverlust wurde sofort durch Applikation gleicher Mengen 0,9 % NaCl-Lösung ausgeglichen. Die erste Blutentnahme erfolgte unmittelbar vor der Applikation (als „Leerwert“), weitere Blutentnahmen erfolgten 2, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 und 300 min nach der Applikation. Durch 10-minütiges Zentrifugieren des Citratblutes bei 3800 U/min und 4 °C wurde das Citratplasma erhalten, worin anschließend die Konzentrationen der Inhibitoren durch HPLC- oder Aktivitätsbestimmung mittels chromogener Methode ermittelt wurden. Um die Eliminationswerte zu erhalten, wurden mindestens drei Einzelbestimmungen durchgeführt. Da für gewöhnlich keine sehr breiten Streuungen zwischen den Einzelbestimmungen auftraten (z.B. gezeigt für **1215** und **1332**; *Abb. 68 und Abb. 69*), wird aus Gründen der Übersichtlichkeit der Grafiken in den meisten Fällen die Mittelwertskurve angegeben.



In Fällen, bei denen zwischen den Einzelversuchen starke Schwankungen beobachtet wurden (z.B. **1331** nach oraler bzw. duodenaler Gabe), sind die Einzelkurven dargestellt (Abb. 55 und Abb. 56).

5.5. Bestimmung der gerinnungshemmenden Wirksamkeit

5.5.1. Gerinnungszeiten

Für die Bestimmung der Gerinnungszeiten wurde humanes Citratplasma verwendet, welches für 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert wurde. Die Messungen wurden bei 37 °C mit dem Koagulometer Thrombotrack (Immuno GmbH, Heidelberg) durchgeführt.

Aus der Abhängigkeit der Gerinnungszeit von der Konzentration des Inhibitors wurde der IC_{200} -Wert berechnet. Dieser gibt die Inhibitorkonzentration an, die eine Verdopplung der Gerinnungszeit bewirkt. Die errechneten IC_{200} -Werte entsprechen den Mittelwerten aus mindestens drei Einzelbestimmungen, deren Einzelwerte nicht mehr als 25 % voneinander abweichen.

Thrombinzeit (TT)

100 µl humanes Citratplasma wurden mit 50 µl Inhibitorlösung in NaCl (0,9 %; 5 % Ethanol) versetzt und für 2 min bei 37 °C inkubiert. Die Gerinnung wurde durch Zugabe von 50 µl Thrombin (2,5 IE/ml in 0,9 % NaCl mit 1 % HSA, Herstellung siehe oben) gestartet.

Prothrombinzeit (PT)

50 µl der Inhibitorlösung in $CaCl_2$ (0,025 M; 5 % Ethanol) wurden mit 50 µl Thromboplastin (Dade Diagnostika GmbH, Unterschleißheim) für 2 min bei 37 °C inkubiert. Die Gerinnung wurde durch Zugabe von 50 µl humanem Citratplasma gestartet.

Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)

50 µl humanes Citratplasma wurden mit 50 µl PTT-Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim) für 3 min bei 37 °C inkubiert. Die Gerinnung wurde durch Zugabe von 50 µl $CaCl_2$ -Lösung (0,025 M; 5 % Ethanol), die den Inhibitor enthielt, gestartet.

5.5.2. Thrombosemodell nach Wessler

Die antithrombotische Wirksamkeit der Verbindungen wurde nach der von Wessler und Mitarbeitern am Kaninchen beschriebenen Methode der venösen Thrombose geprüft [Wessler *et al.*, 1959], die an die Größenverhältnisse der Ratte angepasst wurde [Thomas, 1996]. Es wurden weibliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 270 bis 320 g eingesetzt. Die Ratte wurde mit 1,25 g/kg Körpergewicht *i.p.* Ethylurethan narkotisiert. Beide *Venae jugulares* wurden in einer Länge von 10 bis 15 mm freipräpariert. Um jeweils beide Venen wurde proximal und distal eine Schlinge gelegt, um diesen Venenabschnitt später abbinden zu können. Die zu untersuchende Verbindung wurde, wie oben beschrieben, als Injektionslösung vorbereitet und in die *Vena femoralis* appliziert. Die einzelnen Inhibitoren wurden zunächst jeweils in einer Dosierung von 1 mg/kg Körpergewicht appliziert, bei sehr wirksamen Verbindungen wurde die Dosis schrittweise verringert. Das Applikationsvolumen von 0,5 ml wurde in einer Zeit von 30 Sekunden injiziert. Nach 5 min wurde Glaskontakt-aktiviertes Humanserum in einer Dosis von 1,32 ml/kg Körpergewicht innerhalb von 30 Sekunden ebenfalls in die *Vena femoralis* appliziert. Nach weiteren 30 Sekunden erfolgte das Abbinden der freipräparierten *Venae jugulares*. Die *in situ* belassenen Venensegmente (ca. 10 mm Länge) wurden nach einer Stase von 20 min herausgeschnitten und in einer mit Natriumcitrat gefüllten Petrischale geöffnet. Die gebildeten Thromben aus beiden Venensegmenten wurden getrennt beurteilt (siehe unten) und der Mittelwert aus beiden Bestimmungen gebildet. Der errechnete Thrombus-Score entspricht den Mittelwerten aus mindestens drei Einzelbestimmungen.

Die Thromben wurden makroskopisch folgendermaßen beurteilt:

0 = flüssiges Blut, keine Thromben

1 = ein oder mehrere kleine Thromben

2 = mehrere größere Thromben, die aber das Gefäß nicht vollständig ausfüllen

3 = großer Thrombus, welcher der Größe des abgebundenen Venensegments entspricht.

5.6. Allgemeine Synthesevorschriften

In diesem Teil sind allgemeine Vorschriften zur Synthese von Grundbausteinen aufgeführt, die nach den üblichen peptidchemischen Standardmethoden durchgeführt wurden [Goodman *et al.*, 2004. *Methods of Organic Chemistry* (Houben-Weyl)]. Diese Synthesen wurden bei Bedarf mit größeren Mengen wiederholt, Nachsynthesen werden nicht gesondert angegeben.

Vorschrift A [Moroder *et al.*, 1976]

Einführung von Boc-Schutzgruppen

1 mmol Aminokomponente wurde in 5 ml Dioxan und 2,5 ml Wasser gelöst und bei 0 °C mit 1,1 mmol 1 N NaOH und 1,1 mmol di-*tert.*-butyl-Pyrocarbonat (= DiBoc) versetzt. Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH auf 8,5-9,5 eingestellt und der Ansatz für 3 h bei Raumtemperatur (RT) gerührt. Nach DC- oder HPLC-Kontrolle des Umsatzes wurde bei Bedarf DiBoc sowie 1 N NaOH nachdosiert und der Ansatz über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand mit Essigester aufgenommen, je 2 x mit 5 % KHSO₄-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und die organische Phase mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand getrocknet.

Vorschrift B

Abspaltung von Boc-, tBu-Ether- oder tBu-Ester-Schutzgruppen mit 1 N HCl/Eisessig

1 mmol Boc- oder tBu-Verbindung wurde in 1 ml Eisessig angelöst und mit 5 ml 1 N HCl in Eisessig versetzt. Der Ansatz wurde gelegentlich umgeschüttelt. Nach 1 h wurde das Lösungsmittel etwas eingeeengt und das Produkt durch Zugabe von trockenem Diethylether gefällt, auf einer Fritte abgesaugt, mit Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Vorschrift C

Abspaltung von Boc-, tBu-Ether- oder tBu-Ester-Schutzgruppen mit 90 % TFA

1 mmol Boc- oder tBu-Verbindung wurde mit 5 ml 90 % TFA versetzt. Der Ansatz wurde gelegentlich umgeschüttelt. Nach 1 h wurde das Lösungsmittel etwas eingeeengt und das Produkt durch Zugabe von Diethylether gefällt, auf einer Fritte abgesaugt, mit Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Falls das Produkt aufgrund des im Lösungsmittel enthaltenen Wassers nicht direkt gefällt werden konnte, wurde das Wasser durch mehrmalige Zugabe von Toluol und anschließendes Einengen des Lösungsmittels im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Methanol angelöst und das Produkt durch Zugabe von Diethylether gefällt, auf einer Fritte abgesaugt, mit Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Vorschrift C¹

Abspaltung von Boc-Schutzgruppen oder tBu-Ethern und -Ethern mit 90 % TFA

Die Durchführung erfolgte analog *Vorschrift C*. Nach 1 h wurde das Lösungsmittel etwas eingeeengt und das Produkt aus Wasser oder 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Vorschrift D

Abspaltung von Cbz-Schutzgruppen mit HBr/Eisessig

1 mmol Cbz-Verbindung wurde in 10 ml 33% HBr in Eisessig gelöst und bei RT geschüttelt. Nach 1 h wurde das Lösungsmittel etwas eingeeengt und das Produkt durch Zugabe von Diethylether gefällt, auf einer Fritte abgesaugt, mit Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Vorschrift E

Hydrierung mit Wasserstoff und Katalysator in 90 % Essigsäure

100 mg der zu hydrierenden Verbindung wurden in 50 ml 90 % Essigsäure gelöst und mit 10 mg Katalysator (10 % m/m Pd/C) versetzt. Der Ansatz wurde bei RT und Normaldruck über Nacht mit Wasserstoff hydriert. Anschließend wurde der Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt. Der verbleibende Rückstand wurde in etwas Eisessig angelöst und das Produkt durch Zugabe von Diethylether gefällt, auf einer Fritte abgesaugt, mit Ether gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Vorschrift E¹

Hydrierung mit Wasserstoff und Katalysator in 90 % Essigsäure

Die Durchführung erfolgte analog *Vorschrift E*. Der verbleibende Rückstand wurde über präparative RP-HPLC gereinigt und das Produkt aus Wasser oder 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Vorschrift F [Frérot *et al.*, 1991]

PyBOP-Kopplung

1 mmol des Salzes der Aminokomponente wurde zusammen mit 1 mmol Carboxylkomponente, 1 mmol PyBOP und 3 mmol DIEA in DMF gelöst. Der Ansatz wurde 20 min bei 0 °C und weitere 2 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand wurde mit Essigester aufgenommen und je 2 x mit 5 % KHSO₄-Lösung, gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, anschließend mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand getrocknet.

Vorschrift F^l

PyBOP-Kopplung ohne Waschen (für sehr hydrophile Verbindungen)

Die Durchführung erfolgte analog *Vorschrift F*. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand wurde über präparative RP-HPLC gereinigt und das Produkt aus Wasser oder 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Vorschrift G

Mischanhydridverfahren

1 mmol Carboxylkomponente wurde in DMF gelöst. Unter Rühren wurden bei -15 °C 1 mmol N-Methylmorpholin und 1 mmol Chlorameisensäure-isobutylester zugegeben. Nach 10 min wurden 1 mmol des Salzes der Aminokomponente und nochmals 1 mmol N-Methylmorpholin zugegeben. Der Ansatz wurde für 1 h bei -15 °C und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit Essigester aufgenommen und je 2 x mit 5 % KHSO₄-Lösung, gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, anschließend mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde im Vakuum getrocknet und gegebenenfalls aus einem geeigneten Lösungsmittel umkristallisiert.

Vorschrift H [Schwarz *et al.*, 1981]

Einführung von Sulfonylgruppen nach Silylierung

1 mmol Aminokomponente (Aminosäure) wurde in 20 ml DCM suspendiert und mit 2,2 mmol Chlortrimethylsilan und 2,2 mmol DIEA versetzt und der Ansatz 1 h bei 60 °C unter Rückfluss gerührt bis alles gelöst war. Anschließend wurde der Ansatz auf RT abgekühlt und mit 1,1 mmol Sulfonsäurechlorid und weiteren 1,1 mmol DIEA versetzt. Der pH wurde mit DIEA auf 7,5-8 eingestellt und der Ansatz für 3 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in Wasser gelöst und der pH dieser Lösung mit 1 N NaOH-Lösung auf 8-9,5 eingestellt. Die Wasserphase wurde 2 x mit geringen Mengen Essigester extrahiert und anschließend mit verdünnter HCl-Lösung auf pH 2,5-3,5 eingestellt bis das Produkt auszufallen begann. Die Wasserphase wurde 3 x mit Essigester extrahiert, die vereinigte Essigesterphase 2 x mit 5 % KHSO₄-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde im Vakuum getrocknet.

Vorschrift H'

Einführung von Sulfonylgruppen mit Silylierung (für sehr hydrophile Verbindungen)

Die Durchführung erfolgte analog ***Vorschrift H***. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in Wasser gelöst. Die Wasserphase wurde ohne weitere pH-Einstellung 2 x mit geringen Mengen Essigester gewaschen und eingengt. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC gereinigt und das Produkt aus Wasser oder 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Vorschrift I

Einführung von Sulfonylgruppen nach Schotten-Baumann

1 mmol Aminokomponente wurde in 10 ml Dioxan und 5 ml Wasser gelöst und der pH mit ca. 1 mmol 1 N NaOH auf 8-9 eingestellt. Bei 0 °C wurde 1,25 mmol Sulfonsäurechlorid portionsweise zugegeben. Der Umsatz wurde mittels DC oder HPLC kontrolliert, gegebenenfalls wurde Sulfonsäurechlorid nachdosiert und der pH mit 1 N NaOH wieder auf 8-9 eingestellt. Der Ansatz wurde bei RT gerührt, bis keine freie Aminokomponente mehr nachweisbar war. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand wurde mit Essigester aufgenommen und je 2 x mit 5 % KHSO₄-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, anschließend mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand getrocknet.

Vorschrift J [Copéret *et al.*, 1998]

Synthese der Pyridin-N-Oxide durch Oxidation mit MTO

1 mmol des TFA-Salzes der Pyridyl-Verbindung wurde in 50 ml DCM gelöst und mit 0,02 mmol MTO (Methyl-Rhenium-Trioxid), 1,5 mmol DIEA und 1,5 mmol 50 % Wasserstoffperoxid versetzt. Der Ansatz wurde 90 min im Ultraschallbad geschüttelt, anschließend wurde die DCM-Phase im Vakuum entfernt und das überschüssige Wasserstoffperoxid durch Zugabe von festem Kaliumpermanganat zerstört. Nach Zugabe von 50 ml Acetonitril wurde der entstandene Niederschlag abzentrifugiert und der Überstand im Vakuum eingengt. Der verbleibende Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC gereinigt und das Produkt aus Wasser oder 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Vorschrift K [Bremner *et al.*, 1997a, 1997b]

Synthese der Pyridin-N-Oxide durch Oxidation mit *m*-CPBA

1 mmol Pyridyl-Verbindung wurde in 10 ml trockenem DCM gelöst und bei RT mit 1,5 mmol *m*-CPBA (*meta*-Chlor-Perbenzoesäure) versetzt. Lag die Pyridyl-Verbindung als Salz vor, wurde zusätzlich 1 mmol DIEA zugegeben. Alle 2 h erfolgte eine HPLC-Kontrolle des Umsatzes und es wurde gegebenenfalls *m*-CPBA nachdosiert, bis der Umsatz über 90 % betrug. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und Rückstand über präparative RP-HPLC gereinigt. Das Produkt wurde aus Wasser oder 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Vorschrift L [Stüber *et al.*, 1995]

Synthese der Hydroxyamide durch Umsetzung eines Nitrils mit Hydroxylamin

1 mmol Cyano-Verbindung sowie 1,5 mmol Hydroxylamin x HCl und 1,5 mmol DIEA wurden in 10 ml wasserfreiem Ethanol gelöst. Der Ansatz wurde 6 h unter Rückfluss gekocht und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde im Vakuum getrocknet und ohne weitere Reinigung für die anschließende Acetylierung verwendet.

Vorschrift M [Judkins *et al.*, 1996]

Acetylierung der Hydroxyamide

1 mmol Hydroxyamido-Verbindung wurde in 3 ml Essigsäure gelöst, mit 3 mmol Acetanhydrid versetzt und 30 min bei RT stehen gelassen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand mit Essigester aufgenommen, 3 x mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, anschließend mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde im Vakuum getrocknet.

Vorschrift N

Verseifung der Methyl- oder Ethylester mit 1 N NaOH

1 mmol des Esters wurde in einer Mischung aus 10 ml Wasser und 10 ml Dioxan gelöst und der pH mit 5 mmol 1 N NaOH auf 11-12 eingestellt. Nach 1,5 h wurde die Reaktion abgebrochen, die Lösung mit 10 % TFA neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der verbleibende Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC gereinigt und das Produkt aus Wasser oder 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Vorschrift O

Verseifung der Methyl- oder Ethylester mit 1 N LiOH

1 mmol des Esters wurde in einer Mischung aus 10 ml Wasser und 10 ml Methanol gelöst und der pH mit 5 mmol 1 N LiOH auf 11-12 eingestellt. Nach ca. 2,5 h (HPLC-Kontrolle) wurde die Reaktion abgebrochen, die Lösung mit 10 % TFA neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der verbleibende Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC gereinigt und das Produkt aus Wasser oder 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Vorschrift P

Reduktion der Acetylhydroxyamidino mit Zink in Eisessig

1 mmol Acetylhydroxyamidino-Verbindung wurde in 50 ml Eisessig gelöst und mit Zinkstaub versetzt. Der Ansatz wurde 1 h bei RT gerührt, anschließend wurde der verbliebene Zinkstaub abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde über präparative RP-HPLC gereinigt und das Produkt aus Wasser oder 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Vorschrift Q [Arnold u. Dowall, 1948]

Synthese der Natriumsalze Ring-substituierter Benzylsulfonsäuren

10 mmol Benzylbromid wurde zusammen mit 11 mmol Na₂SO₃ in 50 ml Wasser gelöst und 30 h bei 130 °C unter Rückfluss erhitzt. Die heiße Lösung wurde filtriert und im Vakuum bis zum Einsetzen der Kristallisation eingeeengt. Der Ansatz wurde auf 0-4 °C gekühlt. Die entstehenden Kristalle wurden auf einer Fritte abgesaugt und im Vakuum getrocknet.

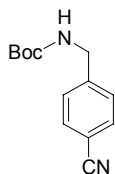
Vorschrift R [Johnson u. Hill, 1914]

Umwandlung der Natriumsalze von Benzylsulfonsäuren in die Sulfonsäurechloride

10 mmol Natriumsalz der Sulfonsäure wurde mit 11 mmol PCl₅ gemischt und mit Phosphorylchlorid versetzt. Der Ansatz wurde für 4-5 h bei 80 °C erhitzt, anschließend wurde die Reaktion abgebrochen und der Ansatz auf Eis gegossen. Die Produkt-Eiswasser-Mischung wurde kräftig gerührt, wobei das Produkt langsam auskristallisierte. Das ausgefallene Produkt wurde auf einer Fritte abgesaugt und im Vakuum getrocknet.

5.6.1. Synthese der P1-Bausteine

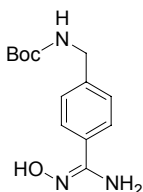
1a) Boc-4-Cyanobenzylamid



100 g (0,593 mol) 4-Cyanobenzylamin x HCl (Showa Denko, Tokyo, Japan) wurden nach *Vorschrift A* umgesetzt.

Ausbeute: 132,6 g (0,57 mol, 96 %) weißer Feststoff, HPLC: 51,6 % B¹⁶.

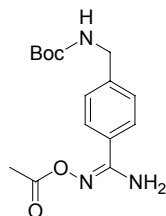
1b) Boc-4-Hydroxyamidinobenzylamid



130 g (0,56 mol) Produkt **1a** wurden nach *Vorschrift L* umgesetzt.

Ausbeute: Öl (Rohprodukt¹⁷), HPLC: 29 % B.

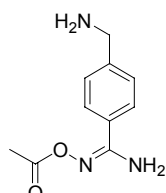
1c) Boc-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid



Das Rohprodukt **1b** wurde nach *Vorschrift M* acetyliert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Produkt aus Essigester kristallisiert.

Ausbeute: 110,6 g (0,36 mol, 64 %) kristalliner Feststoff, HPLC: 39,76 % B.

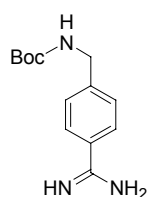
1d) H-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamin x HCl



50 g (0,163 mol) Produkt **1c** wurden nach *Vorschrift B* umgesetzt. Nach kurzer Zeit begann das Produkt auszufallen und wurde nach 75 min auf einer Fritte abgesaugt, mit Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 36 g (0,147 mol, 90 %) weißer Feststoff, HPLC: 14,2 % B.

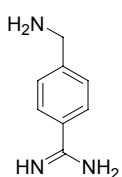
1e) Boc-4-Amidinobenzylamid x HCl



5 g (16 mmol) Produkt **1c** wurden nach *Vorschrift E* hydriert. Der Rückstand wurde mit 1,5 Äquivalenten 1 N HCl in Eisessig angelöst und mit Ether gefällt.

Ausbeute: 4,5 g (15,7 mmol, 98 %) weißer Feststoff, HPLC: 28,0 % B.

1f) H-4-Amidinobenzylamin x 2 HCl



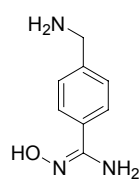
1 g (3,5 mmol) Produkt **1e** wurden nach *Vorschrift B* umgesetzt. Nach einigen Minuten begann das Produkt auszufallen und wurde nach 1 h auf einer Fritte abgesaugt, mit Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 750 mg (3,4 mmol, 97 %) weißer Feststoff, HPLC: 3,8 % B.

¹⁶ "% B" gibt die Acetonitrilkonzentration an, bei der die Verbindung in der RP-HPLC eluiert (vgl. Kapitel 5.1.).

¹⁷ Bei Rohprodukten, die nicht gereinigt wurden und deshalb noch Salze enthalten, wird bei der Ausbeute keine Masse angegeben.

1g) H-4-Hydroxyamidinobenzylamin x 2 TFA

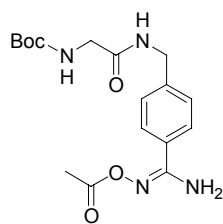


3,0 g (11,3 mol) Produkt **1b** wurden nach *Vorschrift C* umgesetzt.

Ausbeute: 3,9 g (9,9 mmol, 88 %) HPLC: 4,9 % B.

5.6.2. Synthese der P2-P1-Segmente

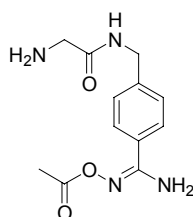
2a) Boc-Gly-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid



3,594 g (20,52 mmol) Boc-Gly-OH und 5 g (20,52 mmol) H-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamin x HCl (**1d**) wurden nach *Vorschrift G* gekoppelt.

Ausbeute: 5,3 g (14,5 mmol, 70 %) amorpher Feststoff, HPLC: 31,8 % B.

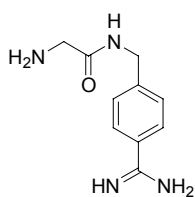
2b) H-Gly-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x HCl



5,3 g (14,5 mmol) Produkt **2a** wurden nach *Vorschrift B* umgesetzt

Ausbeute: 4,3 g (14,3 mmol, 98 %), weißer Feststoff, HPLC: 10,3 % B.

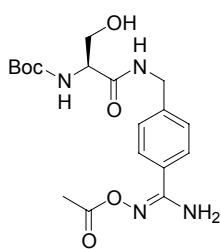
2c) H-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl



1 g (3,33 mmol) Produkt **2b** wurden bei 50 °C nach *Vorschrift E* hydriert. Der Rückstand wurde mit 3 Äquivalenten 1 N HCl in Eisessig angelöst und mit Ether gefällt.

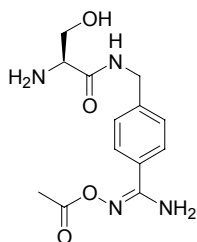
Ausbeute: 644 g (2,31 mmol, 69 %) weißer Feststoff, HPLC: 9,6 % B.

3a) Boc-Ser-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid

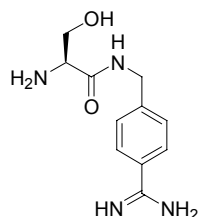


25,05 g (122,1 mmol) Boc-Ser-OH und 29,75 g (122,1 mmol) H-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamin x HCl (**1d**) wurden nach *Vorschrift G* gekoppelt, aber nur 2 x mit geringen Mengen gesättigter NaHCO₃- und NaCl-Lösung gewaschen.

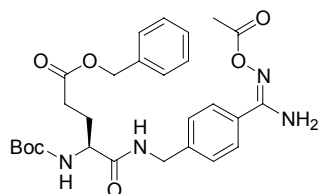
Ausbeute: 43 g (109 mmol, 89 %) helles Öl, HPLC: 29,9 % B.

3b) H-Ser-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x TFA

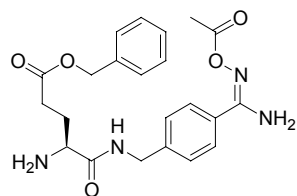
43 g (109 mmol) Produkt **3a** wurden nach *Vorschrift C* umgesetzt.
Ausbeute: 36,6 g (89,6 mmol, 82 %) weißer Feststoff,
HPLC: 13,9 % B.

3c) H-Ser-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl

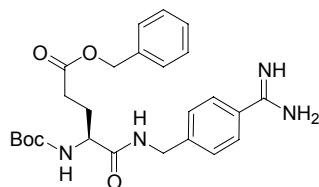
60 mg (0,147 mmol) Produkt **3b** wurden nach *Vorschrift E*
hydriert. Der Rückstand wurde in 1 N HCl angelöst, anschließend
eingengt und das Produkt aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.
Ausbeute: 45 mg (0,145 mmol, 98 %) helles Öl, HPLC: 4,3 % B.

4a) Boc-Glu(OBzl)-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid

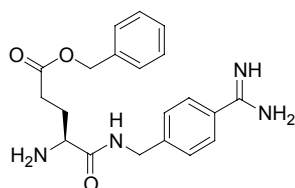
500 mg (1,48 mmol) Boc-Glu(OBzl)-OH und 361,2 mg
(1,48 mmol) H-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamin x HCl (**1d**)
wurden nach *Vorschrift G* gekoppelt.
Ausbeute: 670 mg (1,27 mmol, 86 %) amorpher Feststoff,
HPLC: 52,1 % B.

4b) H-Glu(OBzl)-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x HCl

335 g (0,64 mmol) Produkt **4a** wurden nach *Vorschrift B*
umgesetzt.
Ausbeute: 277 mg (0,6 mmol, 94 %), weißer Feststoff,
HPLC: 32,9 % B.

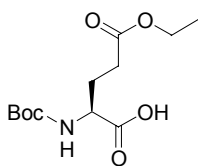
4c) Boc-Glu(OBzl)-4-Amidinobenzylamid x HCl

100 mg (0,3 mmol) Boc-Glu(OBzl)-OH und 66 mg (0,3 mmol)
H-4-Amidinobenzylamin x 2 HCl (**1f**) wurden nach *Vorschrift G*
gekoppelt, aber nicht gewaschen.
Ausbeute: (Rohprodukt) helles Öl, HPLC: 52,2 % B.

4d) H-Glu(OBzl)-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl

Das gesamte Rohprodukt **4c** wurde nach *Vorschrift B* umgesetzt.
Ausbeute: 123,5 mg (0,28 mmol, 93 %), gelblicher Feststoff,
HPLC: 24,9 % B.

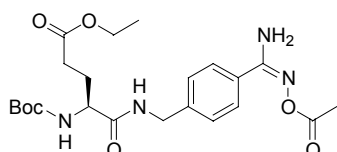
5a) Boc-Glu(OEt)-OH



4 g (22,8 mmol) H-Glu(OEt)-OH und 5,45 g (25 mmol) DiBoc wurden nach *Vorschrift A* umgesetzt. Statt 1 N NaOH wurden 6,14 g (73,1 mmol) NaHCO₃ zugegeben. Nach HPLC-Kontrolle des Umsatzes wurden 2,5 g (12,5 mmol) DiBoc nachdosiert.

Ausbeute: 5,23 g (19 mmol, 83 %) helles Öl, HPLC: 42,3 % B.

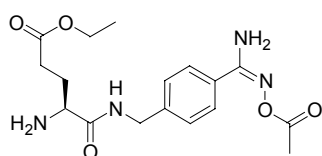
5b) Boc-Glu(OEt)-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid



500 mg (1,82 mmol) Boc-Glu(OEt)-OH (**5a**) und 442,6 mg (1,82 mmol) H-4-Acetylhydroxy-amidinobenzylamin x HCl (**1d**) wurden nach *Vorschrift G* gekoppelt.

Ausbeute: 567 mg (1,22 mmol, 67 %) amorpher Feststoff, HPLC: 43,5 % B.

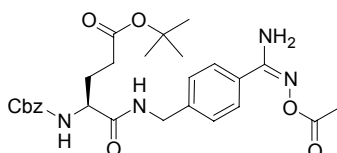
5c) H-Glu(OEt)-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x HCl



290 g (0,62 mmol) Produkt **5b** wurden nach *Vorschrift B* umgesetzt.

Ausbeute: 250 mg (0,62 mmol, 99 %), weißer Feststoff, HPLC: 24,4 % B.

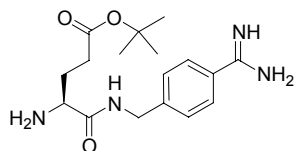
6a) Cbz-Glu(OtBu)-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid



1 g (2,96 mmol) Cbz-Glu(OtBu)-OH und 722 mg (2,96 mmol) H-4-Acetylhydroxy-amidinobenzylamin x HCl (**1d**) wurden nach *Vorschrift G* gekoppelt.

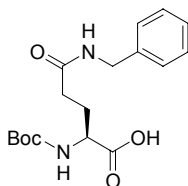
Ausbeute: 1,31 g (2,49 mmol, 84 %) weißer Feststoff, HPLC: 53,8 % B.

6b) H-Glu(OtBu)-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl



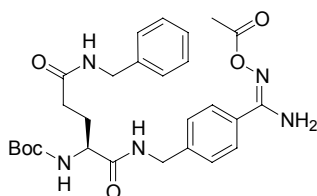
700 mg (1,33 mmol) Produkt **6a** wurden nach *Vorschrift E* hydriert. Der Rückstand wurde mit 2 Äquivalenten 1 N HCl in Eisessig angelöst und mit Ether gefällt.

Ausbeute: 530 mg (1,17 mmol, 88 %) weißer Feststoff, HPLC: 23,5 % B.

7a) Boc-Glu(NH-Bzl)-OH

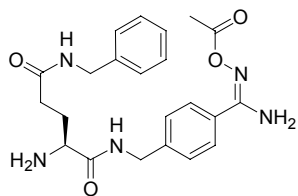
1 g (2,964 mmol) Boc-Glu-OBzl und 342 μ l (2,964 mmol) Benzylamin wurden nach *Vorschrift F* gekoppelt. Das erhaltene Zwischenprodukt wurde nach *Vorschrift E* hydriert aber nicht gefällt, sondern mit Essigester aufgenommen, 2 x mit geringen Mengen gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum eingengt und der Rückstand getrocknet.

Ausbeute: 920 mg (2,74 mmol, 93 %) helles Öl, HPLC: 41,7 % B.

7b) Boc-Glu(NH-Bzl)-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid

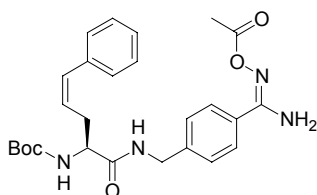
500 mg (1,49 mmol) Boc-Glu(NH-Bzl)-OH (**7a**) und 362 mg (1,486 mmol) H-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamin x HCl (**1d**) wurden nach *Vorschrift G* gekoppelt.

Ausbeute: 772 g (1,47 mmol, 98 %) weißer Feststoff, HPLC: 43,1 % B.

7c) H-Glu(NH-Bzl)-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x HCl

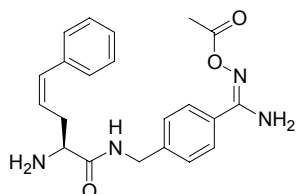
200 mg (0,38 mmol) Produkt **7b** wurden nach *Vorschrift B* umgesetzt.

Ausbeute: 124,8 mg (0,27 mmol, 71 %), weißer Feststoff, HPLC: 27,9 % B.

8a) Boc-Styrylalaninyl-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid

100 mg (0,33 mmol) Boc-Styrylalanin-OH (Acros) und 79,5 mg (0,33 mmol) H-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamin x HCl (**1d**) wurden nach *Vorschrift G* gekoppelt.

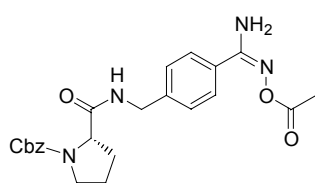
Ausbeute: 151 mg (0,3 mmol, 94 %) amorpher Feststoff, HPLC: 52,9 % B.

8b) H-Styrylalaninyl-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x HCl

151 mg (0,31 mmol) Produkt **8a** wurden nach *Vorschrift B* umgesetzt.

Ausbeute: 118 mg (0,28 mmol, 90 %), weißer Feststoff, HPLC: 30,1 % B.

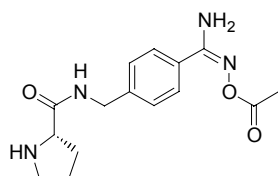
9a) Cbz-Pro-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid



2,5 g (10 mmol) Cbz-Pro-OH und 2,44 g (10 mmol) H-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamin x HCl (**1d**) wurden nach *Vorschrift G* gekoppelt.

Ausbeute: 3,8 g (8,7 mmol, 87 %) weißes Pulver, HPLC: 40,4 % B.

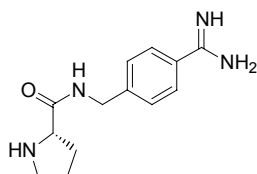
9b) H-Pro-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x HBr



2 g (4,6 mmol) Produkt **9a** wurden nach *Vorschrift D* umgesetzt.

Ausbeute: 1,3 g (3,4 mmol, 74 %) weißer Feststoff, HPLC: 18,0 % B.

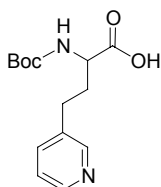
9c) H-Pro-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl



5 g (11,4 mmol) Produkt **9a** wurden nach *Vorschrift E* hydriert. Der Rückstand wurde in 1 N HCl angelöst, anschließend eingengt und das Produkt aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Ausbeute: 2,5g (7,8 mmol, 68 %) weißer Feststoff, HPLC: 10,4 % B.

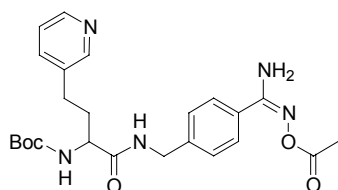
10a) Boc-D,L-hAla(3-Pyr)-OH x TFA



300 mg (1,66 mmol) H-D,L-hAla(3-Pyr)-OH (**44**) wurden nach *Vorschrift A* umgesetzt. Nach HPLC-Kontrolle des Umsatzes wurden 40 mg (0,183 mmol) DiBoc sowie 183 µl (0,183 mmol) 1 N NaOH nachdosiert. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC gereinigt und das Produkt aus Wasser lyophilisiert.

Ausbeute: 560 mg (1,42 mmol, 86 %) weißer Feststoff, HPLC: 22,9 % B.

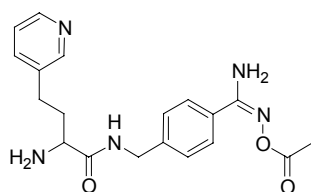
10b) Boc-D,L-hAla(3-Pyr)-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid



300 mg (0,76 mmol) Boc-D,L-hAla(3-Pyr)-OH x TFA (**10a**) und 185 mg (0,76 mmol) H-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamin x HCl (**1d**) wurden nach *Vorschrift F* gekoppelt, aber nur mit geringen Mengen gesättigter NaHCO₃- und NaCl-Lösung gewaschen.

Ausbeute: 350 mg (0,75 mmol, 98 %) gelbes Öl, HPLC: 28,0 % B.

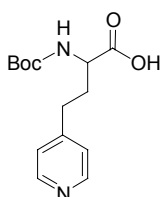
10c) H-D,L-hAla(3-Pyr)-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x 2 HCl



350 mg (0,75 mmol) Produkt **10b** wurden nach *Vorschrift B* umgesetzt.

Ausbeute: 327 mg (0,74 mmol, 98 %), weißer Feststoff, HPLC: 16,5 % B.

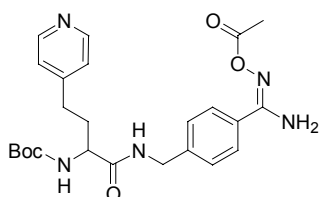
11a) Boc-D,L-hAla(4-Pyr)-OH x TFA



300 mg (1,66 mmol) H-D,L-hAla(4-Pyr)-OH (**45**) wurden nach *Vorschrift A* umgesetzt. Nach HPLC-Kontrolle des Umsatzes wurden 200 mg (0,915 mmol) DiBoc sowie 915 µl (0,915 mmol) 1 N NaOH nachdosiert. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC gereinigt und das Produkt aus Wasser lyophilisiert.

Ausbeute: 614 mg (1,56 mmol, 94 %) weißer Feststoff, HPLC: 23,0 % B.

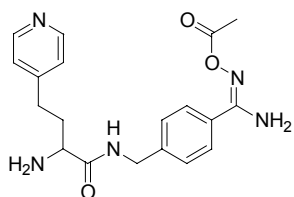
11b) Boc-D,L-hAla(4-Pyr)-Acetylhydroxyamidinobenzylamid



300 mg (0,76 mmol) Boc-D,L-hAla(4-Pyr)-OH x TFA (**11a**) und 185 mg (0,76 mmol) H-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamin x HCl (**1d**) wurden nach *Vorschrift F* gekoppelt, aber nur mit gesättigter NaHCO₃- und NaCl-Lösung gewaschen.

Ausbeute: 355 mg (0,75 mmol, 98 %) gelbes Öl, HPLC: 27,9 % B.

11c) H-D,L-hAla(4-Pyr)-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x 2 HCl

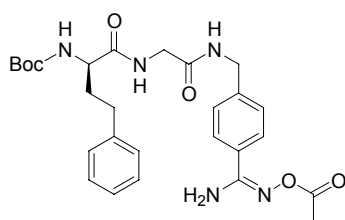


350 mg (0,75 mmol) Produkt **11b** wurden nach *Vorschrift B* umgesetzt.

Ausbeute: 332 mg (0,75 mmol, 99 %), weißer Feststoff, HPLC: 16,0 % B.

5.6.3. Synthese der P3-P2-P1-Bausteine

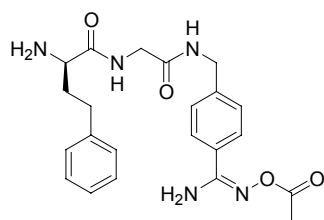
12a) Boc-D-hPhe-Gly-Acetylhydroxyamidinobenzylamid



280 mg (1 mmol) Boc-D-hPhe-OH und 300,7 mg (1 mmol) H-Gly-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x HCl (**2b**) wurden nach *Vorschrift F* gekoppelt.

Ausbeute: 245 mg (0,81 mmol, 81 %) helles Öl, HPLC: 47,8 % B.

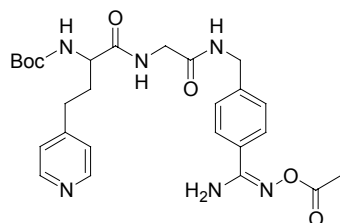
12b) H-D-hPhe-Gly-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x HCl



245 mg (0,81mmol) Produkt **12a** wurden nach *Vorschrift B* umgesetzt.

Ausbeute: 351 mg (0,76 mmol, 94 %), weißer Feststoff, HPLC: 27,9 % B.

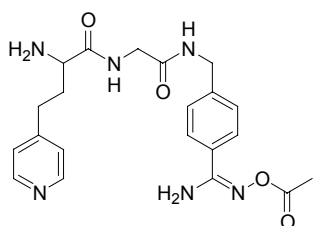
13a) Boc-D,L-hAla(4-Pyr)-Gly-Acetylhydroxyamidinobenzylamid



350 mg (1,25 mmol) Boc-D,L-hAla(4-Pyr)-OH (RSP Amino Acids, Shirley, MA, USA) und 375,5 mg (1,25 mmol) H-Gly-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x HCl (**2b**) wurden nach *Vorschrift F* gekoppelt, aber nur jeweils mit geringen Mengen gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen.

Ausbeute: 605,6 mg (1,15 mmol, 92 %) amorpher Feststoff, HPLC: 27,1 % B.

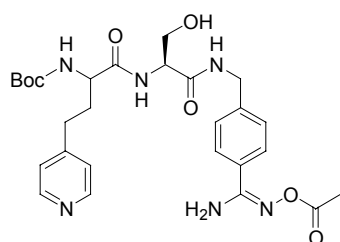
13b) H-D,L-hAla(4-Pyr)-Gly-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x 2 HCl



220 mg (0,42 mmol) Produkt **13a** wurden nach *Vorschrift B* umgesetzt.

Ausbeute: 180 mg (0,39 mmol, 93 %), weißer Feststoff, HPLC: 15,6 % B.

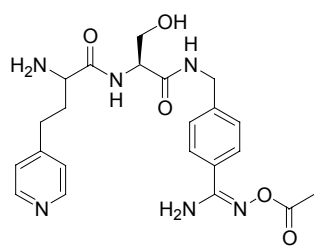
14a) Boc-D,L-hAla(4-Pyr)-Ser-Acetylhydroxyamidinobenzylamid



140 mg (0,5 mmol) Boc-D,L-hAla(4-Pyr)-OH (RSP Amino Acids, Shirley, MA, USA) und 165,5 mg (0,5 mmol) H-Ser-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x TFA (**3b**) wurden nach *Vorschrift F* gekoppelt, aber nur jeweils mit geringen Mengen gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen.

Ausbeute: 245 mg (0,44 mmol, 88 %) amorpher Feststoff, HPLC: 26,9 % und 27,3 % B (Diastereomere, die nicht getrennt wurden).

14b) H-D,L-hAla(4-Pyr)-Ser-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x 2 TFA

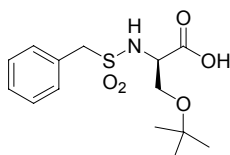


185 mg (0,33 mmol) Produkt **14a** wurden nach *Vorschrift C* umgesetzt.

Ausbeute: 165 mg (0,3 mmol, 90 %), weißer Feststoff, HPLC: 12,0 und 12,4 % B (Diastereomere, die nicht getrennt wurden).

5.6.4. Synthese der P4-P3-Segmente

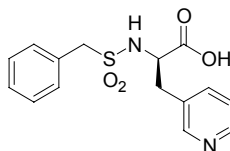
15) Bzls-D-Ser(tBu)-OH



20,2 g (125 mmol) H-D-Ser(tBu)-OH und 25 g (131 mmol) Phenylmethansulfonylchlorid (= Bzls-Cl) wurden nach *Vorschrift H* gekoppelt.

Ausbeute: 32,1 g (102 mmol, 82 %) weißer Feststoff, HPLC: 47,5 % B.

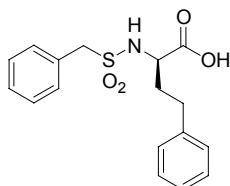
16) Bzls-D-Ala(3-Pyr)-OH x TFA



250 mg (1,5 mmol) H-D-Ala(3-Pyr)-OH und 430 mg (2,25 mmol) Bzls-Cl wurden nach *Vorschrift I* gekoppelt, es wurden insgesamt 3 x 145 mg (0,75 mmol) Bzls-Cl nachdosiert und über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC gereinigt und das Produkt aus Wasser lyophilisiert.

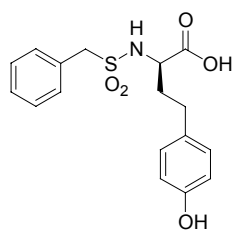
Ausbeute: 300 mg (0,93 mmol, 62 %) weißer Feststoff, HPLC: 23,5 % B .

17) Bzls-D-hPhe-OH



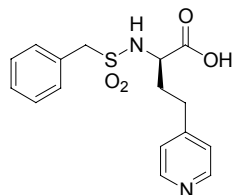
500 mg (2,8 mmol) H-D-hPhe-OH und 533 mg (2,8 mmol) Bzls-Cl wurden nach *Vorschrift I* gekoppelt, es wurden insgesamt 3 x 267 mg (1,4 mmol) Bzls-Cl nachdosiert und über Nacht gerührt.

Ausbeute: 680 mg (2,1 mmol, 73 %) amorpher Feststoff, HPLC: 51,7 % B.

18) Bzls-D-hTyr-OH

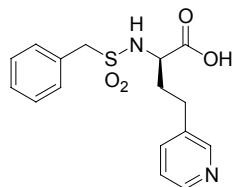
300 mg (1,1 mmol) H-D-hTyr-OH x HBr (Advanced ChemTech, Louisville, KY, USA) und 229 mg (1,2 mmol) Bzls-Cl wurden nach **Vorschrift H** gekoppelt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Produkt aus Essigester kristallisiert.

Ausbeute: 353 mg (1,01 mmol, 92 %) weißer Feststoff, HPLC: 40,8 % B.

19) Bzls-D,L-hAla(4-Pyr)-OH x TFA

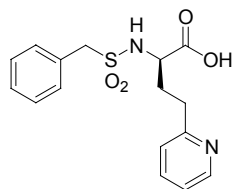
100 mg (0,55 mmol) H-D,L-hAla(4-Pyr)-OH (**45**) und 115,4 mg (0,61 mmol) Bzls-Cl wurden nach **Vorschrift H¹** gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 230 mg (0,51 mmol, 93 %) weißer Feststoff, HPLC: 24,5 % B.

20) Bzls-D,L-hAla(3-Pyr)-OH x TFA

300 mg (1,66 mmol) H-D,L-hAla(3-Pyr)-OH (**44**) und 349 mg (1,83 mmol) Bzls-Cl wurden nach **Vorschrift H¹** gekoppelt und gereinigt.

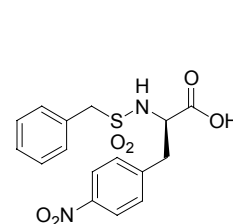
Ausbeute: 691 mg (1,54 mmol, 93 %) weißer Feststoff, HPLC: 24,7 % B.

21) Bzls-D,L-hAla(2-Pyr)-OH x TFA

270 mg (1,5 mmol) H-D,L-hAla(2-Pyr)-OH (**43b**) und 315 mg (1,65 mmol) Bzls-Cl wurden nach **Vorschrift H¹** gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 619 mg (1,38 mmol, 92 %) weißer Feststoff, HPLC: 24,9 % B.

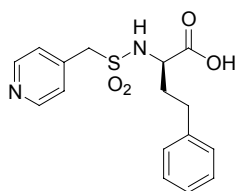
¹H NMR, 300,13 MHz, D₂O, σ ppm: 8,62 d, breit, ³J{HH} = 6,0 Hz, 1H; 8,49, dd ³J{HH} = 7,9 Hz, ³J{HH} = 7,4 Hz, 1H; 7,90 dd ³J{HH} = 7,4 Hz, ³J{HH} = 6,0 Hz, 1H; 7,87 d ³J{HH} = 6,0 Hz, 1H; 7,42 m 5H; 4,49 s 2H; 3,84 dd ³J{HH} = 8,2 Hz, ³J{HH} = 5,2 Hz, 1H; 3,13 t ³J{HH} = 7,6 Hz, 2H, 2,21 m 2H. ¹³C NMR, 75,48 MHz, D₂O, σ ppm: 174,53; 163,08 q ²J{CF} = 35,7 Hz; 155,55; 147,42; 141,19; 131,26; 129,45; 129,33; 128,87; 127,68; 125,55; 116,72 q ¹J{CF} = 292,0 Hz; 59,65; 55,83; 31,56; 29,53.

22) Bzls-D-Phe(4-NO₂)-OH

200 mg (0,95 mmol) H-D-Phe(4-NO₂)-OH (Advanced ChemTech, Louisville, KY, USA) und 181 mg (0,95 mmol) Bzls-Cl wurden nach **Vorschrift I** gekoppelt, es wurden 60 mg (0,32 mmol) Bzls-Cl und 1 ml 1 N NaOH nachdosiert.

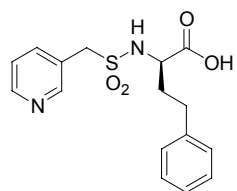
Ausbeute: 230 mg (0,63 mmol, 66 %) amorpher Feststoff, HPLC: 49,5 % B.

23) 4-Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-OH x TFA



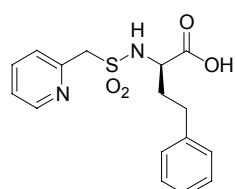
100 mg (0,56 mmol) H-D-hPhe-OH und 191,4 mg (0,56 mmol) 4-Pyridylmethylsulfonylchlorid x Triflat (Array Biopharma, Boulder, CO, USA) wurden nach *Vorschrift H^I* gekoppelt und gereinigt.
Ausbeute: 231 mg (0,52 mmol, 93 %) weißer Feststoff, HPLC: 32,0 % B.

24) 3-Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-OH x TFA



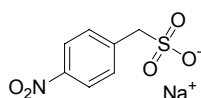
65 mg (0,36 mmol) H-D-hPhe-OH und 137 mg (0,4 mmol) 3-Pyridylmethylsulfonylchlorid x Triflat (Array Biopharma, Boulder, CO, USA) wurden nach *Vorschrift H^I* gekoppelt und gereinigt.
Ausbeute: 150 mg (0,34 mmol, 94 %) weißer Feststoff, HPLC: 31,8 % B.

25) 2-Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-OH x TFA



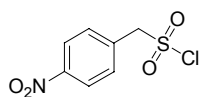
65 mg (0,36 mmol) H-D-hPhe-OH und 137 mg (0,4 mmol) 2-Pyridylmethylsulfonylchlorid x Triflat (Array Biopharma, Boulder, CO, USA) wurden nach *Vorschrift H^I* gekoppelt und gereinigt.
Ausbeute: 145 mg (0,32 mmol, 89 %) weißer Feststoff, HPLC: 33,5 % B.

26a) Natriumsalz der 4-Nitrobenzylsulfonsäure



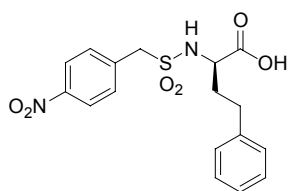
20 g (93 mmol) 4-Nitrobenzylbromid wurden nach *Vorschrift Q* umgesetzt.
Ausbeute: 19,4 g (81 mmol, 87 %) kristalliner Feststoff, HPLC: 20,1 % B.

26b) 4-Nitrobenzylsulfonylchlorid = 4-NO₂-Bzls-Cl



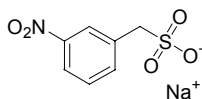
7 g (29,3 mmol) Produkt **26a** wurden nach *Vorschrift R* umgesetzt.
Ausbeute: 6,6 g (28 mmol, 96 %) kristalliner Feststoff, HPLC: *nicht möglich*¹⁸.

¹⁸ Eine HPLC-Bestimmung ist nicht möglich, da die Sulfonsäurechloride (**26b**, **27b**, **33b**) unter den HPLC-Bedingungen nahezu sofort hydrolysieren und nur die korrespondierende Sulfonsäure detektiert wird. Zur Reaktionskontrolle können die Sulfonsäurechloride nach Inkubation in einer Mischung aus Pyridin und Methanol jedoch als Methylester nachgewiesen werden.

26c) 4-NO₂-Bzls-D-hPhe-OH

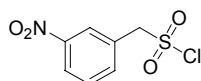
691 mg (3,86 mmol) H-D-hPhe-OH und 1 g (4,24 mmol) 4-NO₂-Bzls-Cl (**26b**) wurden nach *Vorschrift H* gekoppelt. Das Produkt wurde aus Essigester kristallisiert.

Ausbeute: 1,0 g (2,7 mmol, 70 %) weißer Feststoff, HPLC: 54,7 % B.

27a) Natriumsalz der 3-Nitrobenzylsulfonsäure

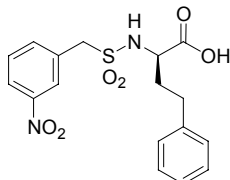
5 g (23 mmol) 3-Nitrobenzylbromid wurden nach *Vorschrift Q* umgesetzt.

Ausbeute: 4,4 g (18,3 mmol, 80 %) kristalliner Feststoff, HPLC: 20,6 % B.

27b) 3-Nitrobenzylsulfonchlorid = 3-NO₂-Bzls-Cl

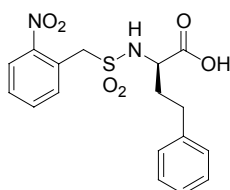
3 g (12,5 mmol) Produkt **27a** wurden nach *Vorschrift R* umgesetzt.

Ausbeute: 2,3 g (9,8 mmol, 81 %) kristalliner Feststoff, HPLC: *nicht möglich*.

27c) 3-NO₂-Bzls-D-hPhe-OH

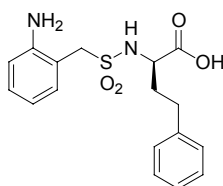
691 mg (3,86 mmol) H-D-hPhe-OH und 1 g (4,24 mmol) 3-NO₂-Bzls-Cl (**27b**) wurden nach *Vorschrift H* gekoppelt. Das Produkt wurde aus Essigester kristallisiert.

Ausbeute: 1,23 g (3,25 mmol, 84 %) weißer Feststoff, HPLC: 54,1 % B.

28) 2-NO₂-Bzls-D-hPhe-OH

215 mg (1,2 mmol) H-D-hPhe-OH und 300 mg (1,3 mmol) 2-NO₂-Bzls-Cl (kommerziell erhältlich) wurden nach *Vorschrift H* gekoppelt. Das Produkt wurde aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

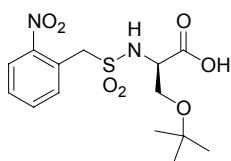
Ausbeute: 275 mg (0,73 mmol, 61 %) gelbes Öl, HPLC: 52,5 % B.

28a) 2-NH₂-Bzls-D-hPhe-OH x AcOH

50 mg (0,13 mmol) Produkt **28** wurden nach *Vorschrift E* hydriert. Das Produkt wurde nicht gefällt, sondern aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Ausbeute: 38 mg (0,11 mmol, 85 %) hellgelber Feststoff, HPLC: 39,8 % B.

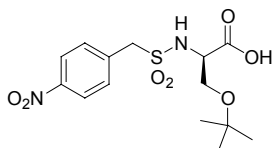
29) 2-NO₂-Bzls-D-Ser(tBu)-OH



435 mg (2,7 mmol) H-D-Ser(tBu)-OH und 700 mg (3 mmol) 2-NO₂-Bzls-Cl wurden nach *Vorschrift H* gekoppelt.

Ausbeute: 936 mg (2,6 mmol, 96 %) amorpher Feststoff, HPLC: 48,2 % B.

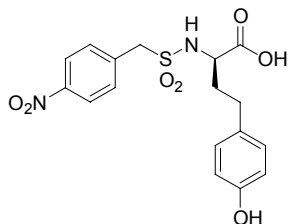
30) 4-NO₂-Bzls-D-Ser(tBu)-OH



297 mg (1,66 mmol) H-D-Ser(tBu)-OH und 430 mg (1,82 mmol) 4-NO₂-Bzls-Cl (**26b**) wurden nach *Vorschrift H* gekoppelt. Das Produkt wurde aus Essigester kristallisiert.

Ausbeute: 575 mg (1,6 mmol, 96 %) gelber Feststoff, HPLC: 50,8 % B.

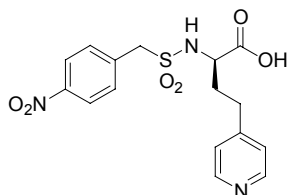
31) 4-NO₂-Bzls-D-hTyr-OH



200 mg (0,724 mmol) H-D-hTyr-OH x HBr und 1 g (4,24 mmol) 4-NO₂-Bzls-Cl (**26b**) wurden nach *Vorschrift H* gekoppelt.

Ausbeute: 275 mg (0,7 mmol, 97 %) amorpher Feststoff, HPLC: 44,5 % B.

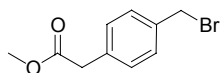
32) 4-NO₂-Bzls-D,L-hAla(4-Pyr)-OH x TFA



150 mg (0,7 mmol) H-D,L-hAla(4-Pyr)-OH (**45**) und 177 mg (0,75 mmol) 4-NO₂-Bzls-Cl (**26b**) wurden nach *Vorschrift H'* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 310 mg (0,63 mmol, 90 %) weißer Feststoff, HPLC: 27,8 % B.

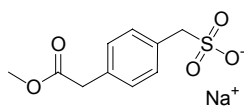
33a) 4-(MeOOCCH₂)Benzylbromid



3 g (13,1 mmol) 4-(Brommethyl)phenylacetic acid wurden in einem Gemisch aus 60 ml Benzol und 30 ml Methanol gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es wurde eine 2 M Lösung von Trimethylsilyldiazomethan in Hexan bis zur bleibenden Gelbfärbung und ausbleibenden Gasentwicklung zugetropft (insges. ca. 13 ml = 26 mmol). Der Ansatz wurde für 4 h bei RT gerührt und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 4,35 g (Rohprodukt) gelbes Öl, HPLC: 55,9 % B.

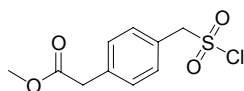
33b) Natriumsalz der 4-(MeOOCCH₂)Benzylsulfonsäure



4,35 g Rohprodukt **33a** wurden nach *Vorschrift Q* umgesetzt.

Ausbeute: 1,67 g (6,25 mmol, 48 %) weißer Feststoff,
HPLC: 20,5 % B.

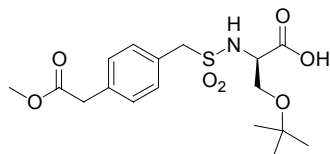
33c) 4-(MeOOCCH₂)Benzylsulfonylchlorid = 4-(MeOOCCH₂)Bzls-Cl



1,47 g (5,5 mmol) Produkt **33b** wurden nach *Vorschrift R* umgesetzt.

Ausbeute: 820 mg (3,12 mmol, 57 %) weißer Feststoff,
HPLC: *nicht möglich*.

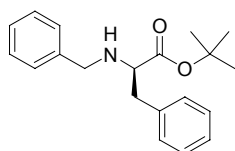
33d) 4-(MeOOCCH₂)Bzls-D-Ser(tBu)-OH



233,75 mg (1,45 mmol) H-D-Ser(tBu)-OH und 400 mg (1,52 mmol) Produkt **33c** wurden nach *Vorschrift H* gekoppelt.

Ausbeute: 335 mg (0,86 mmol, 59 %) gelbes Öl, HPLC: 47,6 % B.

34a) H-D-N(Bzl)-Phe-OtBu [Gilon *et al.*, 2004]

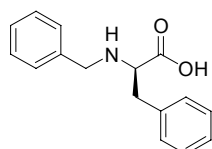


1 g (3,88 mmol) H-D-Phe-OtBu x HCl (Orpegen), 393,3 µl Benzaldehyd (3,88 mmol) und 543,2 µl TEA wurden in 50 ml trockenem Methanol mit 1 % Eisessig (0,5 ml) gelöst und mit etwas Molsieb A3 im Ansatz für 1 h bei RT gerührt. Der Ansatz wurde auf 0 °C gekühlt. Über einen Zeitraum von 40 min wurden

243,8 mg (3,88 mmol) Natriumcyanoborhydrid portionsweise zugegeben, der Ansatz wurde für weitere 10 min bei 0 °C und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Das Molsieb wurde abfiltriert, mit Methanol gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit Essigester aufgenommen und 1 x mit 5 % KHSO₄-Lösung, 1 x mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und 2 x mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

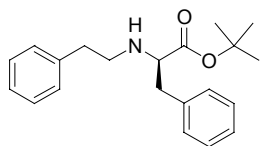
Ausbeute: 1 g (3,21 mmol, 83 %) helles Öl, HPLC: 45,5 % B.

34b) H-D-N(Bzl)-Phe-OH x TFA



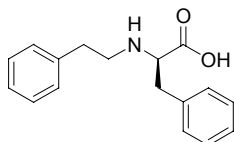
1 g (3,21 mmol) Produkt **34a** wurden nach *Vorschrift C* umgesetzt.

Ausbeute: 925 mg (3,21 mmol, 99 %) weißer Feststoff,
HPLC: 29,8 % B.

35a) H-D-N(PhEt)-Phe-OtBu x TFA

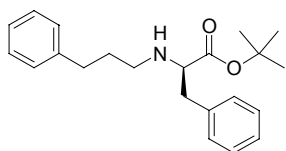
250 mg (0,97 mmol) H-D-Phe-OtBu x HCl wurden mit 170 μ l (1,21 mmol) 1-Brom-2-Phenylpropan in DMF gelöst mit 337 mg (1,46 mmol) Ag₂O versetzt. Der Ansatz wurde bei RT gerührt, nach 48 h wurden 225 mg (0,97 mmol) Ag₂O nachdosiert. Nach 5 Tagen wurden die Silbersalze abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit Essigester aufgenommen und je 1 x mit 5 % KHSO₄-Lösung, gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die Essigesterphase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC gereinigt und die erhaltenen Fraktionen im Vakuum bis zur Trockne eingeengt.

Ausbeute: 33 mg (0,1 mmol, 10 %) helles Öl, HPLC: 49,0 % B.

35b) H-D-N(PhEt)-Phe-OH x TFA

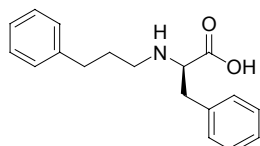
33 mg (0,1 mmol) Produkt **35a** wurden nach *Vorschrift C^l* umgesetzt.

Ausbeute: 25 mg (0,093 mmol, 93 %) weißer Feststoff, HPLC: 34,4 % B.

36a) H-D-N(PhPr)-Phe-OtBu x TFA

250 mg (0,97 mmol) H-D-Phe-OtBu x HCl wurden mit 150 μ l (0,97 mmol) 1-Brom-3-Phenylpropan in DMF gelöst mit 450 mg (1,94 mmol) Ag₂O versetzt. Der Ansatz wurde bei RT gerührt, nach 48 h wurden weitere 75 μ l (0,485 mmol) 1-Brom-3-Phenylpropan und 112,5 mg (0,485 mmol) Ag₂O zugegeben. Nach 14 Tagen wurden die Silbersalze abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde analog der Synthese des Produktes **34a** gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer RP-HPLC gereinigt und die Fraktionen im Vakuum bis zur Trockne eingeengt.

Ausbeute: 170 mg (0,5 mmol, 52 %) helles Öl, HPLC: 50,7 % B.

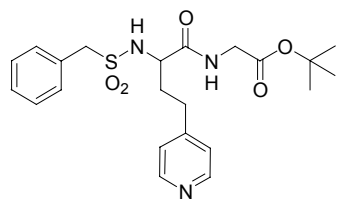
36b) H-D-N(PhPr)-Phe-OH x TFA

70 mg (0,2 mmol) Produkt **36a** wurden nach *Vorschrift C^l* umgesetzt.

Ausbeute: 40,5 mg (0,143 mmol, 72 %) weißer Feststoff, HPLC: 36,5 % B.

5.6.5. Synthese der P4-P3-P2-Bausteine

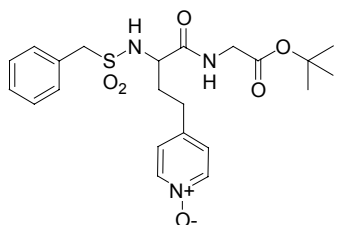
37a) Bzls-D,L-hAla(4-Pyr)-Gly-OtBu x TFA



200 mg (0,45 mmol) Bzls-D,L-hAla(4-Pyr)-OH x TFA (**19**) und 76 mg (0,45 mmol) H-Gly-OtBu x HCl (Advanced ChemTech, Louisville, KY, USA) wurden nach *Vorschrift F^l* gekoppelt und gereinigt.

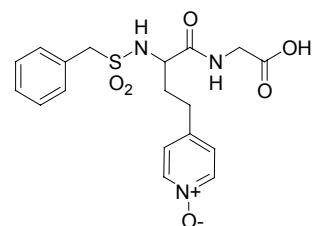
Ausbeute: 213 mg (0,38 mmol, 84 %) weißer Feststoff, HPLC: 36,9 % B.

37b) Bzls-D,L-hAla(4-Pyr-NO)-Gly-OtBu



90 mg (0,16 mmol) Produkt **37a** wurden nach *Vorschrift J* oxidiert. Ausbeute: 38 mg (0,082 mmol, 51 %) weißer Feststoff, HPLC: 39,8 % B.

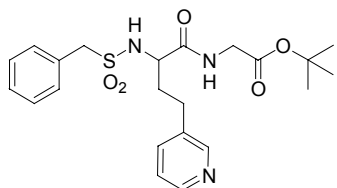
37c) Bzls-D,L-hAla(4-Pyr-NO)-Gly-OH



38 mg (0,082 mmol) Produkt **37b** wurden nach *Vorschrift C^l* umgesetzt.

Ausbeute: 30 mg (0,075 mmol, 91 %) helles Öl, HPLC: 25,2 % B.

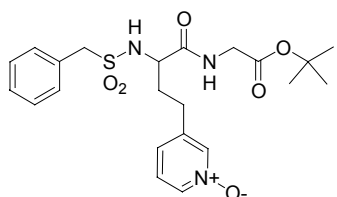
38a) Bzls-D,L-hAla(3-Pyr)-Gly-OtBu x TFA



135 mg (0,3 mmol) Bzls-D,L-hAla(3-Pyr)-OH x TFA (**20**) und 50 mg (0,3 mmol) H-Gly-OtBu x HCl wurden nach *Vorschrift F^l* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 157 mg (0,28 mmol, 93 %) weißer Feststoff, HPLC: 36,7 % B.

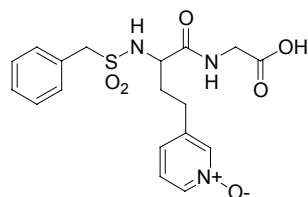
38b) Bzls-D,L-hAla(3-Pyr-NO)-Gly-OtBu



100 mg (0,223 mmol) Produkt **38a** wurden nach *Vorschrift J* oxidiert.

Ausbeute: 93 mg (0,2 mmol, 90 %) weißer Feststoff, HPLC: 40,2 % B.

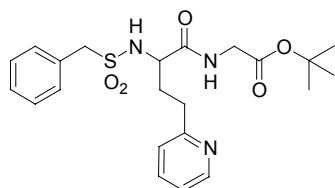
38c) Bzls-D,L-hAla(3-Pyr-NO)-Gly-OH



93 mg (0,2 mmol) Produkt **38b** wurden nach *Vorschrift C^d* umgesetzt.

Ausbeute: 77,4 mg (0,19 mmol, 95 %) gelbes Öl, HPLC: 25,8 % B.

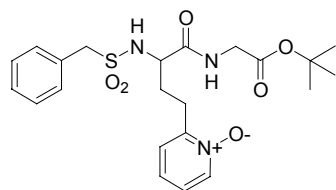
39a) Bzls-D,L-hAla(2-Pyr)-Gly-OtBu x TFA



270 mg (0,6 mmol) Bzls-D,L-hAla(2-Pyr)-OH x TFA (**21**) und 101 mg (0,6 mmol) H-Gly-OtBu x HCl wurden nach *Vorschrift F^d* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 212 mg (0,38 mmol, 63 %) gelblicher Feststoff, HPLC: 36,9 % B.

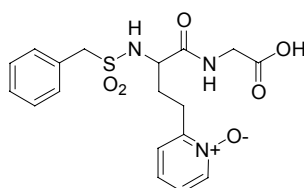
39b) Bzls -D,L-hAla(2-Pyr-NO)-Gly-OtBu



91 mg (0,203 mmol) Produkt **39a** wurden unter Zugabe von 35 μ l (0,203 mmol) DIEA nach *Vorschrift K* mit *m*-CPBA oxidiert. Es wurden insgesamt über 6 h weitere 100 mg (0,406 mmol) *m*-CPBA nachdosiert.

Ausbeute: 88 mg (0,19 mmol, 94 %) weißer Feststoff, HPLC: 42,8 % B.

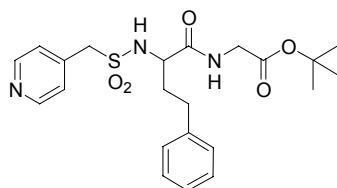
39c) Bzls-D,L-hAla(2-Pyr-NO)-Gly-OH



88 mg (0,19 mmol) Produkt **39b** wurden nach *Vorschrift C^d* umgesetzt.

Ausbeute: 73,3 mg (0,18 mmol, 95 %) amorpher Feststoff, HPLC: 26,8 % B.

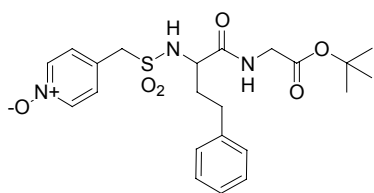
40a) 4-Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-Gly-OtBu x TFA



90 mg (0,2 mmol) 4-Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-OH (**23**) und 33,1 mg (0,2 mmol) H-Gly-OtBu x HCl wurden nach *Vorschrift F^d* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 100 mg (0,18 mmol, 90 %) Öl, HPLC: 40,4 % B.

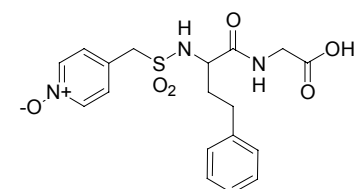
40b) 4-(NO)Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-Gly-OtBu



100 mg (0,18 mmol) Produkt **40a** wurden nach *Vorschrift J* oxidiert.

Ausbeute: 74 mg (0,16 mmol, 89 %) weißer Feststoff, HPLC: 44,9 % B.

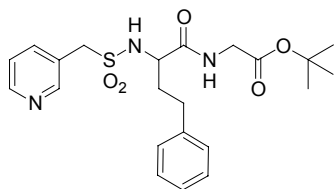
40c) 4-(NO)Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-Gly-OH



74 mg (0,16 mmol) Produkt **40b** wurden nach *Vorschrift C^l* umgesetzt.

Ausbeute: 61 mg (0,15 mmol, 94 %) helles Öl, HPLC: 30,5 % B.

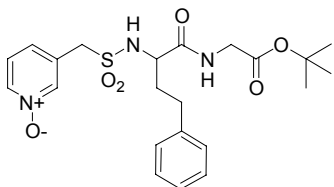
41a) 3-Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-Gly-OtBu x TFA



160 mg (0,36 mmol) 3-Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-OH (**24**) und 60 mg (0,36 mmol) H-Gly-OtBu x HCl wurden nach *Vorschrift F^l* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 186 mg (0,33 mmol, 92 %) helles Öl, HPLC: 40,6 % B.

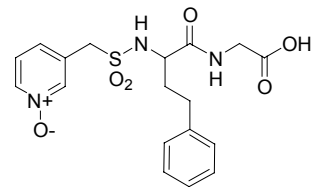
41b) 3-(NO)Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-Gly-OtBu



161 mg (0,36 mmol) Produkt **41a** wurden nach *Vorschrift J* oxidiert.

Ausbeute: 141 mg (0,3 mmol, 83 %) weißer Feststoff, HPLC: 44,9 % B.

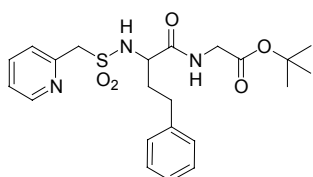
41c) 3-(NO)Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-Gly-OH



141 mg (0,3 mmol) Produkt **41b** wurden nach *Vorschrift C^l* umgesetzt.

Ausbeute: 122 mg (0,3 mmol, 99 %) gelbes Öl, HPLC: 30,7 % B.

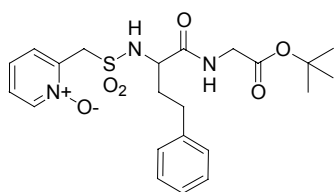
42a) 2-Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-Gly-OtBu x TFA



160 mg (0,36 mmol) 2-Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-OH (**25**) und 60 mg (0,36 mmol) H-Gly-OtBu x HCl wurden nach *Vorschrift F^l* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 146mg (0,26 mmol, 72 %) helles Öl, HPLC: 34,9 % B.

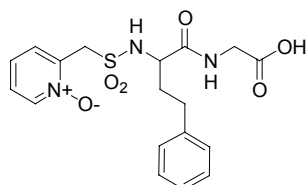
42b) 2-(NO)Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-Gly-OtBu



161 mg (0,36 mmol) Produkt **42a** wurden nach *Vorschrift J* oxidiert.

Ausbeute: 148,4 mg (0,32 mmol, 89 %) weißer Feststoff, HPLC: 45,0 % B.

(42c) 2-(NO)Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-Gly-OH

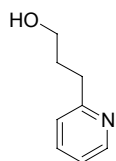


148,4 mg (0,32 mmol) Produkt **42b** wurden nach *Vorschrift C^d* umgesetzt.

Ausbeute: 130 mg (0,32 mmol, 99 %) amorpher Feststoff, HPLC: 32,0 % B.

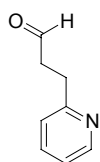
5.6.6. Aminosäuresynthese und Racemattrennung

43a) 3-(2-Pyridyl)-propanal [Mancuso *et al.*, 1979]



105,7 g kommerziell erhältliches 3-(2-Pyridyl)-propanol (braunes Öl) wurden unter Vakuum destilliert (2 mbar, 105-107 °C).

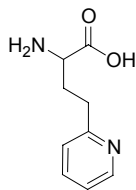
Ausbeute: 100,6 g (0,73 mol) farbloses Öl, DC: R_f 0,42.



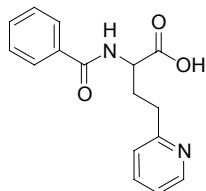
35 ml (0,41 mol) Oxalylchlorid wurden in 700 ml trockenem DCM gelöst und auf -70 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde ein Gemisch aus 62 ml (0,87 mol) DMSO und 40 ml trockenem DCM über einen Zeitraum von 25 min getropft. Dabei wurde die Temperatur strikt unter -65 °C gehalten (exotherme Reaktion). Nach 15 min Rühren bei -70 °C wurden 50 g

(0,36 mol) 3-(2-Pyridyl)-propanol, gelöst in 150 ml trockenem DCM, über einen Zeitraum von maximal 15 min bei unter -65 °C zugetropft. Anschließend wurden 218 ml (0,37 mol) TEA in 40 min zugegeben, danach wurde der Ansatz langsam auf RT erwärmt. Nach Zugabe von 190 ml Wasser lösten sich die gebildeten Salze auf. Die Phasen wurden getrennt, die DCM-Phase wurde im Vakuum eingengt und anschließend das Produkt destilliert (2 mbar, 59-80 °C).

Ausbeute: 33,6 g (0,25 mol, 61 %) farbloses Öl, DC: R_f 0,20.

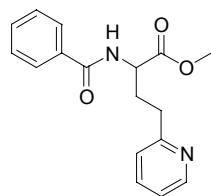
43b) H-D,L-hAla(2-Pyr)-OH [Ratcliffe *et al.*, 1985]

67 g (0,5 mol) 3-(2-Pyridyl)-propanal (**43a**) wurden mit 18 ml Diethylether versetzt und auf 0 °C gekühlt. 88,4 g (1,65 mol) Ammoniumchlorid wurden in 300 ml Wasser gelöst und langsam zur 2-Pyridyl-3-propanal-Lösung hinzugefügt. Die Mischung wurde mit 74,3 g (1,4 mol) Natriumcyanid, gelöst in 200 ml Wasser, versetzt. Der Ansatz wurde für 4 h bei 0 °C gerührt, anschließend für 4 h auf 50 °C erhitzt und wieder auf RT abgekühlt. Der Ansatz wurde 4 x mit 800 ml Chloroform extrahiert und die vereinigten Chloroformphasen im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde in 1 l konzentrierter HCl aufgenommen und für 42 h bei RT gerührt und anschließend für 35 h unter Rückfluss gekocht. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand mehrfach mit Wasser versetzt und der Ansatz im Vakuum wieder eingengt. Der verbliebene Rückstand wurde in 1,5 l Ethanol gelöst und auf 4 °C gekühlt. Die ausgefallenen Salze wurden abgetrennt. Die Mutterlauge wurde eingengt und in 2 Portionen über einen sauren Ionenaustauscher (Dowex[®] 50WX8-200, Ammoniumform, 10 cm x 15 cm) gereinigt. Die Elution des Produktes erfolgte mit 0,2 N Ammoniaklösung. Die erhaltenen Fraktionen wurden im Vakuum eingengt und das Produkt durch Zugabe von Aceton ausgefällt, auf einer Fritte abgesaugt und im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 42 g (0,233 mol, 47 %) hellbrauner Feststoff, HPLC: 4,9 % B, DC: R_f 0,04. ¹H NMR, 500,13 MHz, D₂O, σ ppm: 8.34 d, breit, ³J{HH} = 5 Hz, 1H; 7,72 ddd ³J{HH} = 7,8 Hz, ³J{HH} = 7,3 Hz, ⁴J{HH} = 1,5 Hz, 1H; 7,27 d ³J{HH} = 7,8 Hz, 1H; 7,23 dd ³J{HH} = 5 Hz, ³J{HH} = 7,3 Hz, 1H; 3,78 t ³J{HH} = 6,3 Hz, 1H; 2,84 m 2H, 2,18 m 2H. ¹³C NMR, 125,75 MHz, D₂O, σ ppm: 174,00; 158,80; 147,84; 138,08; 123,52; 121,99; 54,16; 32,38; 30,23.

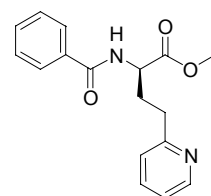
43c) Bz-D,L-hAla(2-Pyr)-OH

17,7 g (98,22 mmol) H-D,L-hAla(2-Pyr)-OH (**43b**) wurden in 60 ml Dioxan und 60 ml Wasser gelöst und bei 0 °C mit 17,95 ml (103,14 mmol) DIEA versetzt. 11,97 ml (103,14 mmol) Benzoylchlorid wurden in 20 ml Dioxan gelöst und ebenfalls bei 0 °C langsam zugetropft. Der Ansatz wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in etwas Eisessig angelöst und mit Essigester versetzt. Bei 4 °C kristallisierte das Produkt aus.

Ausbeute: 23,3 g (81,9 mmol, 83 %) weißer kristalliner Feststoff, HPLC: 20,5 % B.

43d) Bz-D,L-hAla(2-Pyr)-OMe

23,3 g (81,9 mmol) Bz-D,L-hAla(2-Pyr)-OH (**43c**) wurden in 35 ml trockenem Methanol suspendiert und auf $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Es wurden 8,9 ml (122,85 mmol) Thionylchlorid portionsweise zugegeben und der Ansatz für 30 min bei $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Danach wurden weitere 3 ml (40,95 mmol) Thionylchlorid zugegeben. Der Ansatz wurde auf RT erwärmt, über Nacht gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit 800 ml Essigester gelöst, 2 x mit 200 ml gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand getrocknet. Ausbeute: 18,3 g (61,3 mmol, 75 %) amorpher Feststoff, HPLC: 23,7 % B.

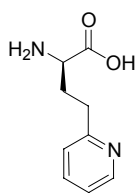
43e) Bz-D-hAla(2-Pyr)-OMe**43f) Bz-hAla(2-Pyr)-OH**

6,3 g (21,1 mmol) Bz-D,L-hAla(2-Pyr)-OMe (**43d**) wurden in 200 ml Methanol gelöst und mit 750 ml einer 0,2 N Ammoniumacetatlösung (pH 7,8) versetzt. Der pH wurde mit verdünnter Ammoniaklösung auf 7,5-8 eingestellt. Die Mischung wurde mit 25 mg α -Chymotrypsin (aus Rinderpankreas, Merck, 350 U/mg), angelöst in 1 ml Wasser, versetzt. Der Ansatz wurde für 3 Tage bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Dabei wurde der pH-Wert regelmäßig kontrolliert und durch Zugabe von verdünnter Ammoniaklösung konstant auf pH 7,5-8 gehalten. Danach wurde der Ansatz mit Essigsäure auf pH 4 eingestellt, das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt und der Rückstand in 2 M Essigsäure gelöst. Durch Zugabe von konzentrierter Ammoniaklösung wurde bei pH 8-9 das D-Derivat ausgefällt, auf einer Fritte abgesaugt, mit geringen Mengen Ammoniakwasser pH 8,5 gewaschen und im Vakuum getrocknet. Zusätzlich wurde die basische Wasserphase 3 x mit Essigester extrahiert, um noch in der Wasserphase vorhandenes D-Derivat zu isolieren. Die Essigesterphase wurde mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt (Bz-D-hAla(2-Pyr)-OMe, **43e**).

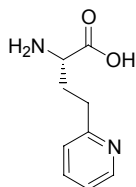
Das in der Wasserphase verbliebene L-Derivat wurde durch mehrmaliges Lyophilisieren aus Wasser von überschüssigem Ammoniumacetat befreit (Bz-hAla(2-Pyr)-OH, **43f**).

Ausbeute: **43e**) 2,65 g (8,9 mmol, 42 %) heller Feststoff, HPLC: 23,7 % B.

43f) 2,42 g (8,5 mmol, 40 %) heller Feststoff, HPLC: 20,5 % B.

43g) H-D-hAla(2-Pyr)-OH

6 g (2,0 mmol) Bz-D-hAla(2-Pyr)-OMe (**43e**) wurden in 100 ml 6 N HCl gelöst und 20 h unter Rückfluss erhitzt (145 °C Ölbad). Nach Abkühlen auf RT wurde die ausgefallene Benzoesäure abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand noch 2 x in Wasser gelöst und der Ansatz im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde über einen sauren Ionenaustauscher (Dowex[®] 50WX8-200, Ammoniumform, 10 cm x 15 cm) gereinigt. Die Elution des Produktes erfolgte mit 0,2 N Ammoniaklösung. Die erhaltenen Fraktionen wurden im Vakuum eingengt und das Produkt durch Zugabe von Aceton ausgefällt, auf einer Fritte abgesaugt, und im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 1,93 g (1,1 mmol) weißer Feststoff, HPLC: 4,9 % B, DC: R_f 0,04.

43h) H-hAla(2-Pyr)-OH

4,1 g (1,5 mmol) Bz-hAla(2-Pyr)-OH (**43f**) wurden in 50 ml 6 M HCl gelöst und analog der Verbindung **43g** aufgearbeitet.

Ausbeute: 2,4 g (1,3 mmol) weißer Feststoff, HPLC: 4,9 % B, DC: R_f 0,04.

Kontrolle der Enantiomerenreinheit mit Marfey's Reagenz [Kochhar u. Christen, 1989]

Marfey's Reagenz (1-Fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-alaninamid) dient zur Kontrolle der Enantiomerenreinheit von Aminosäuren. Durch Kopplung der Probe mit dem chiralen Marfey's Reagenz entstehen zwei Diastereomere, die in der analytischen RP-HPLC unterschiedliche Retentionszeiten haben. Dadurch kann man die Mengenverhältnisse von D- und L-Derivat bestimmen.

H-D-hAla(2-Pyr)-OH (43g)

0,9 mg (0,005 mmol) H-D-hAla(2-Pyr)-OH wurden in 100 µl Wasser gelöst und mit 200 µl 1 % Marfey's Reagenz in Aceton sowie 50 µl 1 M NaHCO₃-Lösung versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 1 N HCl abgebrochen. Es wurden 800 µl Acetonitril und 200 µl Wasser zugegeben und 10 µl dieser Lösung mit RP-HPLC analysiert (*Abb. 70*).

Ergebnis¹⁹: Kopplungsprodukt mit D-Derivat (**43g**), HPLC: 28,71 % B → 93 % (96,4 %).

Kopplungsprodukt mit L-Derivat (**43h**), HPLC: 29,97 % B → 7 % (3,6 %).

¹⁹ Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen den Ergebnissen der 1. Nachsynthese.

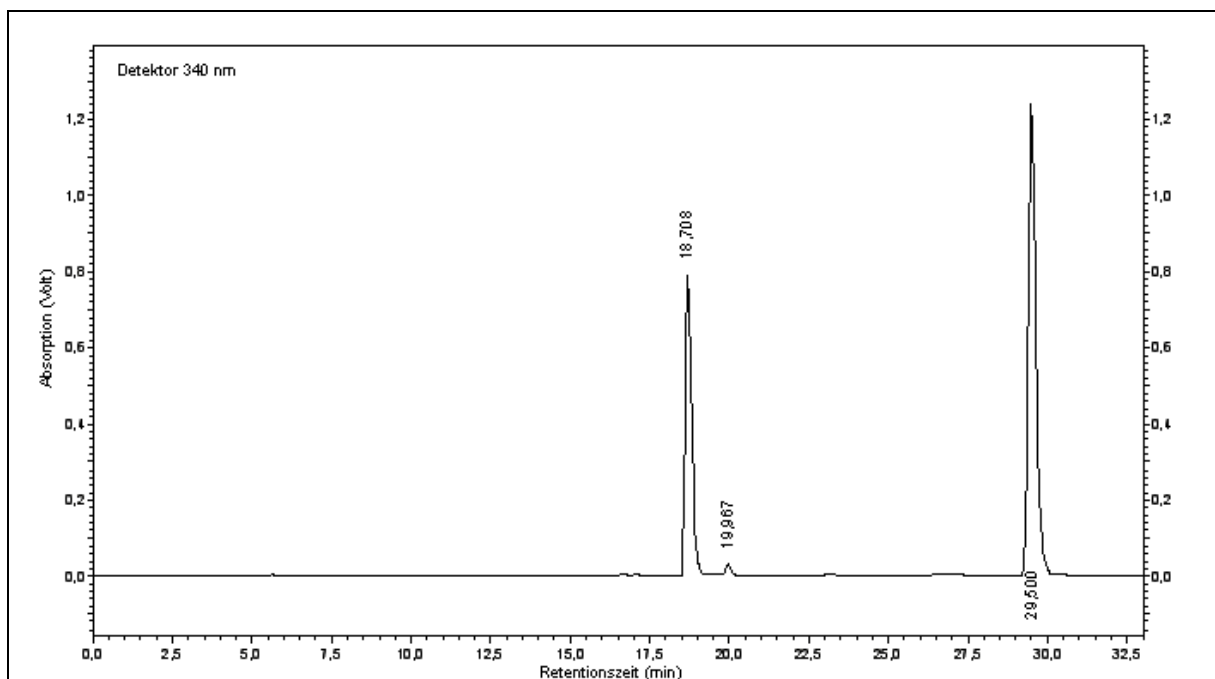


Abb. 70: HPLC-Chromatogramm der erhaltenen D-Aminosäure (H-D-hAla(2-Pyr)-OH; **43g**) nach Racemattrennung und Reaktion mit Marfey's Reagenz. Startbedingungen der HPLC: 10 % B, Flussrate: 1 ml/min, Gradient: 1 % B/min. Die Peaks bei 28,71 % und 29,97 % entsprechen den Kopplungsprodukten mit D- bzw. L-Derivat, der Peak bei 39,50 % stammt vom Marfey's Reagenz.

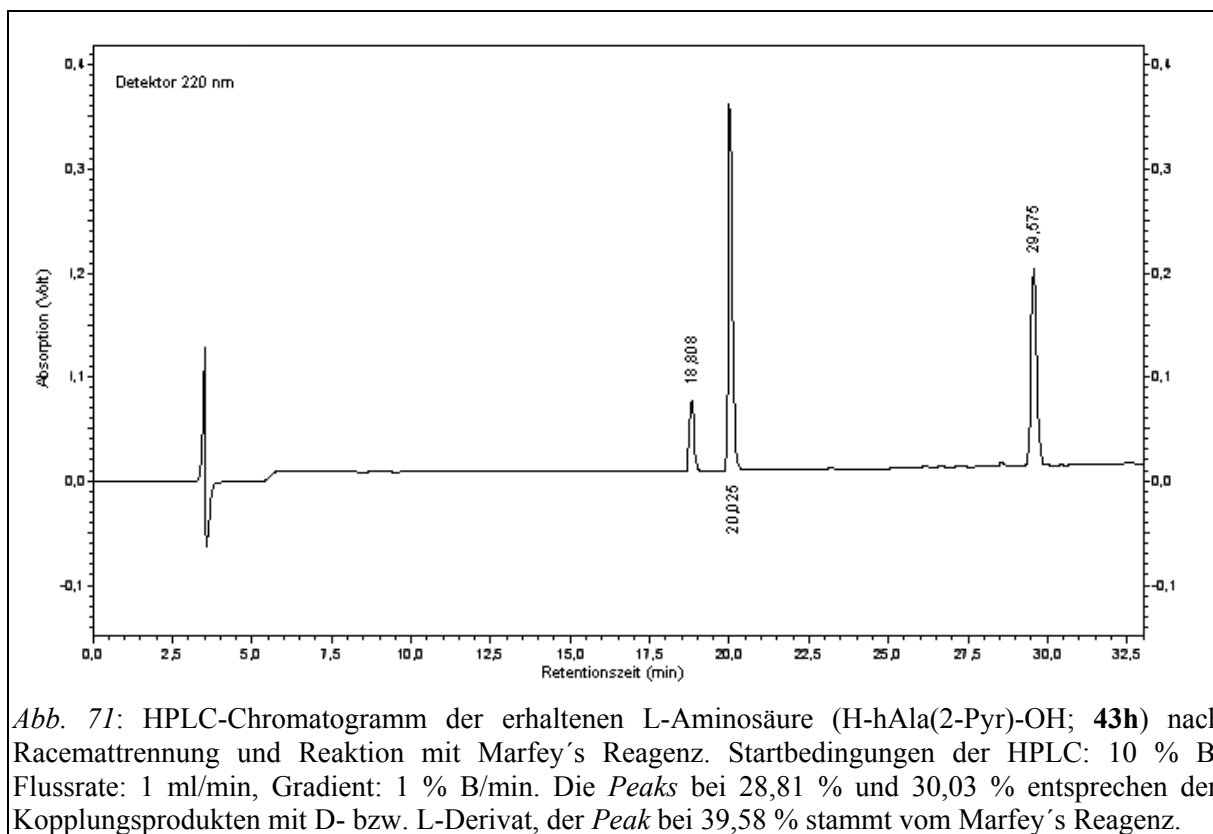
H-hAla(2-Pyr)-OH (**43h**)

0,9 mg (0,005 mmol) H-D-hAla(2-Pyr)-OH wurden analog (**43g**) mit Marfey's Reagenz umgesetzt (Abb. 71).

Ergebnis: Kopplungsprodukt mit D-Derivat (**43g**), HPLC: 28,8 % B → 16,1 %

Kopplungsprodukt mit L-Derivat (**43h**), HPLC: 30,0 % B → 83,9 %

Die Synthese und Racemattrennung der Aminosäuren **H-D,L-hAla(3-Pyr)-OH (44)** und **H-D,L-hAla(4-Pyr)-OH (45)** wurde analog durchgeführt und ist hier nicht gesondert wiedergegeben.



5.6.7. Synthese der Inhibitoren

Bei der Synthese einiger Inhibitoren wurde aufgrund der Kopplung mit einem racemischen Homopyridylalanin-Derivat in der HPLC ein Doppel-Peak beobachtet. Falls möglich, wurden die Diastereomere mit präparativer RP-HPLC getrennt. Die beiden erhaltenen Produkte wurden anhand ihrer Aktivität dem D- bzw. L-Derivat zugeordnet.

700) 4-(MeOOCCH₂)Bzls-D-Ser(tBu)-Gly-4-Amidinobenzylamid x TFA²⁰

150 mg (0,387 mmol) 4-(MeOOCCH₂)Bzls-D-Ser(tBu)-OH (**33d**) und 122,2 mg (0,406 mmol) H-Gly-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x HCl (**2b**) wurden nach *Vorschrift G* gekoppelt. Das erhaltene Zwischenprodukt wurde nach *Vorschrift E* hydriert.

Ausbeute: 194 mg (0,31 mmol, 80 %) Feststoff; Rohprodukt als Acetatsalz, HPLC: 37,2 % B.

64 mg (0,1 mmol) gefälltes Rohprodukt wurden mittels präparativer RP-HPLC gereinigt und das Produkt aus Wasser lyophilisiert.

Ausbeute: 12,5 mg (0,02 mmol, 20 %) weißer Feststoff, HPLC: 37,2 % B, MS: ber. für C₂₇H₃₇N₅O₇S: 575,2 - gef. 576,3 [M+H]⁺.

²⁰ Die Inhibitoren liegen nach der präparativen HPLC als TFA-Salze vor. Im MS wird jedoch nur die freie Base detektiert, für die jeweils die berechnete und gefundene Masse angegeben.

701) 4-(HOOCCH₂)Bzls-D-Ser(tBu)-Gly-4-Amidinobenzylamid x TFA

130 mg (0,21 mmol) gefälltes Rohprodukt **700** wurden nach *Vorschrift N* verseift.

Ausbeute: 20 mg (0,03 mmol) weißer Feststoff, HPLC: 31,9 % B, MS: ber. für C₂₆H₃₅N₅O₇S: 561,2 - gef. 562,3 [M+H]⁺.

705) 4-(MeOOCCH₂)Bzls-D-Ser-Gly-4-Amidinobenzylamid x TFA

5 mg (0,0075 mmol) Verbindung **700** wurden nach *Vorschrift C^l* umgesetzt.

Ausbeute: 4,4 mg (0,007 mmol, 93 %) weißer Feststoff, HPLC: 26,2 % B, MS: ber. für C₂₃H₂₉N₅O₇S: 519,2 - gef. 520,3 [M+H]⁺.

706) 4-(HOOCCH₂)Bzls-D-Ser-Gly-4-Amidinobenzylamid x TFA

5 mg (0,075 mmol) Verbindung **701** wurden nach *Vorschrift C^l* umgesetzt.

Ausbeute: 4,3 mg (0,007 mmol, 93 %) weißer Feststoff, HPLC: 21,7 % B, MS: ber. für C₂₂H₂₇N₅O₇S: 505,2 - gef. 506,3 [M+H]⁺.

718) H-D-N(Bzl)-Phe-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

50 mg (0,18 mmol) H-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl (**2c**) und 48,51 mg (0,18 mmol) H-D-N(Bzl)-Phe-OH x TFA (**34b**) wurden nach *Vorschrift F^l* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 20,3 mg (0,036 mmol, 20 %) weißer Feststoff, HPLC: 24,9 % B, MS: ber. für C₂₆H₂₉N₅O₂: 443,2 - gef. 444,3 [M+H]⁺.

719) H-D-N(PhEt)-D-Phe-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

25 mg (0,093 mmol) H-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl (**2c**) und 26 mg (0,093 mmol) H-D-N(PhEt)-Phe-OH x TFA (**35b**) wurden nach *Vorschrift F^l* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 17 mg (0,03 mmol, 32 %) weißer Feststoff, HPLC: 28,1 % B, MS: ber. für C₂₇H₃₁N₅O₂: 457,3 - gef. 458,3 [M+H]⁺.

726) H-D-N(PhPr)-D-Phe-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

40 mg (0,143 mmol) H-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl (**2c**) und 40,5 mg (0,143 mmol) H-D-N(PhPr)-Phe-OH x TFA (**36b**) wurden nach *Vorschrift F^l* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 60 mg (0,1 mmol, 70 %) weißer Feststoff, HPLC: 30,5 % B, MS: ber. für C₂₈H₃₃N₅O₂: 471,2 - gef. 472,4 [M+H]⁺.

725) Bzls-D-Ala(3-Pyr)-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

100 mg (0,31 mmol) Bzls-D-Ala(3-Pyr)-OH x TFA (**16**) und 87,1 mg (0,31 mmol) H-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl (**2c**) wurden nach *Vorschrift F¹* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 102 mg (0,164 mmol, 53 %) weißer Feststoff, HPLC: 22,0 % B, MS: ber. für C₂₅H₂₈N₆O₄S: 508,2 - gef. 509,5 [M+H]⁺.

738) 4-(MeOOCCH₂)Bzls-D-hPhe-Gly-4-Amidinobenzylamid x TFA

75 mg (0,16 mmol) H-D-hPhe-Gly-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x HCl (**12b**) und 42,7 mg (0,16 mmol) 4-(MeOOCCH₂)Bzls-Cl (**33c**) wurden nach *Vorschrift I* gekoppelt. Es wurden 8,6 mg (0,032 mmol) 4-(MeOOCCH₂)Bzls-Cl und 12 µl (0,032 mmol) DIEA nachdosiert. Das entstandene Zwischenprodukt wurde 5 h nach *Vorschrift E¹* hydriert und gereinigt.

Ausbeute: 52 mg (0,073 mmol, 46 %) weißer Feststoff, HPLC: 40,7 % B, MS: ber. für C₃₀H₃₅N₅O₆S: 593,2 - gef. 594,5 [M+H]⁺.

739) 4-(HOOCCH₂)Bzls-D-hPhe-Gly-4-Amidinobenzylamid x TFA

40 mg (0,056 mmol) Verbindung **738** wurden nach *Vorschrift N* verseift.

Ausbeute: 17 mg (0,025 mmol, 45 %) weißer Feststoff, HPLC: 35,2 % B, MS: ber. für C₂₉H₃₃N₅O₆S: 579,2 - gef. 580,5 [M+H]⁺.

740) Bzls-D,L-hAla(4-Pyr)-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

75 mg (0,162 mmol) H-D,L-hAla(4-Pyr)-Gly-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x 2 HCl (**13b**) und 31 mg (0,162 mmol) Bzls-Cl wurden nach *Vorschrift I* gekoppelt. Es wurden 6,2 mg (0,033 mmol) Bzls-Cl und 6 µl (0,033 mmol) DIEA nachdosiert. Das entstandene Zwischenprodukt wurde 5 h nach *Vorschrift E¹* hydriert und gereinigt.

Ausbeute: 34,6 mg (0,046 mmol, 28 %) weißer Feststoff, HPLC: 23,0 % B, MS: ber. für C₂₆H₃₀N₆O₄S: 522,2 - gef. 523,2 [M+H]⁺.

741) 4-Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

50 mg (0,11 mmol) H-D-hPhe-Gly-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x HCl (**12b**) und 41 mg (0,12 mmol) 4-Pyridylmethylsulfonylchlorid x Triflat wurden nach *Vorschrift H* gekoppelt. Das entstandene Zwischenprodukt wurde nach *Vorschrift E¹* hydriert und gereinigt.

Ausbeute: 30 mg (0,04 mmol, 36 %) weißer Feststoff, HPLC: 26,0 % B, MS: ber. für C₂₆H₃₀N₆O₄S: 522,2 - gef. 523,2 [M+H]⁺.

742) 4-Pyridylmethylsulfonyl-D,L-hAla(4-Pyr)-Gly-4-Amidinobenzylamid x 3 TFA

50 mg (0,11 mmol) H-D,L-hAla(4-Pyr)-Gly-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x 2 HCl (**13b**) und 41 mg (0,12 mmol) 4-Pyridylmethylsulfonylchlorid x Triflat wurden nach *Vorschrift H* gekoppelt. Das erhaltene Zwischenprodukt wurde nach *Vorschrift E^I* hydriert und gereinigt.

Ausbeute: 20 mg (0,023 mmol, 21 %) weißer Feststoff, HPLC: 13,1 % B, MS: ber. für C₂₅H₂₉N₇O₄S: 523,2 - gef. 524,3 [M+H]⁺.

743) 4-Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-Ser-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

50 mg (0,15 mmol) 4-Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-OH x TFA (**23**) und 61 mg (0,15 mmol) H-Ser-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x TFA (**3b**) wurden nach *Vorschrift F* gekoppelt. Das entstandene Zwischenprodukt wurde nach *Vorschrift E^I* hydriert und gereinigt.

Ausbeute: 31 mg (0,04 mmol, 27 %) weißer Feststoff, HPLC: 25,3 % B, MS: ber. für C₂₇H₃₂N₆O₅S: 552,2 - gef. 553,7 [M+H]⁺.

744a) Bzls-D-hAla(4-Pyr)-Ser-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

744b) Bzls-hAla(4-Pyr)-Ser-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

75 mg (0,13 mmol) H-D,L-hAla(4-Pyr)-Ser-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x 2 TFA (**14b**) und 25,1 mg (0,13 mmol) Bzls-Cl wurden nach *Vorschrift H* gekoppelt. Das entstandene Zwischenprodukt wurde nach *Vorschrift E^I* hydriert und die Diastereomere mittels RP-HPLC getrennt.

Ausbeute **744a**: 7 mg (0,01 mmol, 7,7 %) weißer Feststoff, HPLC: 21,7 % B, MS: ber. für C₂₇H₃₂N₆O₅S: 552,2 - gef. 553,7 [M+H]⁺.

Ausbeute **744b**: 8 mg (0,01 mmol, 7,7 %) weißer Feststoff, HPLC: 22,6 % B, MS: ber. für C₂₇H₃₂N₆O₅S: 552,2 - gef. 553,7 [M+H]⁺.

745) Bzls-D-hTyr-Ser-4-Amidinobenzylamid x TFA

50 mg (0,14 mmol) Bzls-D-hTyr-OH (**18**) und 43 mg (0,14 mmol) H-Gly-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x HCl (**2b**) wurden nach *Vorschrift F* gekoppelt. Das entstandene Zwischenprodukt wurde 5 h nach *Vorschrift E^I* hydriert und gereinigt.

Ausbeute: 37,5 mg (0,06 mmol, 41 %) weißer Feststoff, HPLC: 32,5 % B, MS: ber. für C₂₇H₃₁N₅O₅S: 537,2 - gef. 538,6 [M+H]⁺.

746) Bzls-D-hTyr-Ser-4-Amidinobenzylamid x TFA

50 mg (0,14 mmol) Bzls-D-hTyr-OH (**18**) und 58,4 mg (0,14 mmol) H-Ser-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x TFA (**3b**) wurden nach *Vorschrift F* gekoppelt. Das entstandene Zwischenprodukt wurde 5 h nach *Vorschrift E^I* hydriert und gereinigt.

Ausbeute: 38 mg (0,056 mmol, 40 %) weißer Feststoff, HPLC: 31,5 % B, MS: ber. für C₂₈H₃₃N₅O₆S: 567,2 - gef. 568,5 [M+H]⁺.

747) Bzls-D-hPhe-Ser-4-Amidinobenzylamid x TFA

50 mg (0,14 mmol) Bzls-D-hPhe-OH (**17**) und 61 mg (0,15 mmol) H-Ser-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x TFA (**3b**) wurden nach *Vorschrift F* gekoppelt. Das entstandene Zwischenprodukt wurde 5 h nach *Vorschrift E^I* hydriert und gereinigt.

Ausbeute: 32 mg (0,048 mmol, 34 %) weißer Feststoff, HPLC: 37,9 % B, MS: ber. für C₂₈H₃₃N₅O₅S: 551,2 - gef. 552,7 [M+H]⁺.

748) 3-Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

67 mg (0,2 mmol) 3-Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-OH x TFA (**24**) und 56 mg (0,2 mmol) H-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl (**2c**) wurden nach *Vorschrift F^I* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 62,3 mg (0,08 mmol, 40 %) weißer Feststoff, HPLC: 28,2 % B, MS: ber. für C₂₆H₃₀N₆O₄S: 522,2 - gef. 523,7 [M+H]⁺.

749) 2-Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

67 mg (0,2 mmol) 2-Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-OH x TFA (**25**) und 56 mg (0,2 mmol) H-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl (**2c**) wurden nach *Vorschrift F^I* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 69 mg (0,09 mmol, 45 %) weißer Feststoff, HPLC: 30,7 % B, MS: ber. für C₂₆H₃₀N₆O₄S: 522,2 - gef. 523,7 [M+H]⁺.

750) 4-Pyridylmethylsulfonyl-D,L-hAla(4-Pyr)-Ser-4-Amidinobenzylamid x 3 AcOH

55 mg (0,1 mmol) H-D,L-hAla(4-Pyr)-Ser-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x 2 TFA (**14b**) und 36 mg (0,1 mmol) 4-Pyridylmethylsulfonylchlorid x Triflat wurden nach *Vorschrift H* gekoppelt. Das entstandene Zwischenprodukt wurde nach *Vorschrift E^I* hydriert und über Ionenaustausch-chromatographie (Fractogel[®] EMD COO⁻, 16 x 130 mm) gereinigt.

Ausbeute: 17,2 mg (0,023 mmol, 23 %) weißer Feststoff, HPLC: 11,9 % B und 12,5 % B (Diastereomere, die nicht trennbar waren), MS: ber. für C₂₆H₃₁N₇O₅S: 553,2 - gef. 554,4 [M+H]⁺.

751) 2-NO₂-Bzls-D-hPhe-Gly-4-Amidinobenzylamid x TFA

92 mg (0,243 mmol) 2-NO₂-Bzls-D-hPhe-OH (**28**) und 68 mg (0,243 mmol) H-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl (**2c**) wurden nach *Vorschrift F^I* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 124,2 mg (0,183 mmol, 75 %) weißer Feststoff, HPLC: 41,4 % B, MS: ber. für C₂₇H₃₀N₆O₆S: 566,2 - gef. 567,6 [M+H]⁺.

752) 2-NH₂-Bzls-D-hPhe-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

68 mg (0,1 mmol) Verbindung **751** wurden nach *Vorschrift E^I* hydriert und gereinigt.

Ausbeute: 60 mg (0,078 mmol, 78 %) weißer Feststoff, HPLC: 33,9 % B, MS: ber. für C₂₇H₃₂N₆O₄S: 536,2 - gef. 537,4 [M+H]⁺.

753) 2-NO₂-Bzls-D-Ser(tBu)-Gly-4-Amidinobenzylamid x TFA

205 mg (0,57 mmol) 2-NO₂-Bzls-D-Ser(tBu)-OH (**29**) und 159 mg (0,57 mmol) H-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl (**2c**) wurden nach *Vorschrift F^I* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 213 mg (0,32 mmol, 56 %) weißer Feststoff, HPLC: 37,8 % B, MS: ber. für C₂₄H₃₂N₆O₇S: 548,2 - gef. 549,3 [M+H]⁺.

754) 2-NH₂-Bzls-D-Ser(tBu)-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

132 mg (0,2 mmol) Verbindung **753** wurden nach *Vorschrift E^I* hydriert und gereinigt.

Ausbeute: 124 mg (0,17 mmol, 85 %) weißer Feststoff, HPLC: 29,0 % B, MS: ber. für C₂₄H₃₄N₆O₅S: 518,2 - gef. 519,5 [M+H]⁺.

756) 2-NO₂-Bzls-D-Ser-Gly-4-Amidinobenzylamid x TFA

22 mg (0,033 mmol) Verbindung **753** wurden nach *Vorschrift C^I* umgesetzt.

Ausbeute: 20 mg (0,033 mmol, 99 %) weißer Feststoff, HPLC: 25,2 % B, MS: ber. für C₂₀H₂₄N₆O₇S: 492,2 - gef. 493,5 [M+H]⁺.

757) 2-NH₂-Bzls-D-Ser-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

19 mg (0,025 mmol) Verbindung **754** wurden nach *Vorschrift C^I* umgesetzt.

Ausbeute: 17 mg (0,025 mmol, 99 %) weißer Feststoff, HPLC: 18,1 % B, MS: ber. für C₂₀H₂₆N₆O₅S: 462,2 - gef. 463,3 [M+H]⁺.

755) H-D-hPhe-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

60 mg (0,13 mmol) H-D-hPhe-Gly-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x HCl (**12b**) wurden nach *Vorschrift E¹* hydriert und gereinigt.

Ausbeute: 32,5 mg (0,055 mmol, 42 %) weißer Feststoff, HPLC: 22,9 % B, MS: ber. für C₂₀H₂₅N₅O₂: 367,2 - gef. 368,4 [M+H]⁺.

758) Bzls-D-hTyr-Glu-4-Amidinobenzylamid x TFA

75,5 mg (0,22 mmol) Bzls-D-hTyr-OH (**18**) und 100 mg (0,22 mmol) H-Glu(OBzl)-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x HCl (**4b**) wurden nach *Vorschrift F* gekoppelt. Das erhaltene Zwischenprodukt wurde für 48 h bei 50 °C nach *Vorschrift E¹* hydriert und gereinigt.

Ausbeute: 52 mg (0,072 mmol, 33 %) weißer Feststoff, HPLC: 33,5 % B, MS: ber. für C₃₀H₃₅N₆O₇S: 609,2 - gef. 610,7 [M+H]⁺.

759) 4-NO₂-Bzls-D-hPhe-Gly-4-Amidinobenzylamid x TFA

50 mg (0,13 mmol) 4-NO₂-Bzls-D-hPhe-OH (**26c**) wurden mit 37 mg (0,13 mmol) H-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl (**2c**) nach *Vorschrift F¹* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 77,5 mg (0,11 mmol, 85 %) weißer Feststoff, HPLC: 41,6 % B, MS: ber. für C₂₇H₃₀N₆O₆S: 566,2 - gef. 567,6 [M+H]⁺.

760) 4-NH₂-Bzls-D-hPhe-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

50 mg (0,074 mmol) Verbindung **759** wurden 5 h nach *Vorschrift E¹* hydriert und gereinigt.

Ausbeute: 40 mg (0,052 mmol, 70 %) weißer Feststoff, HPLC: 28,1 % B, MS: ber. für C₂₇H₃₂N₆O₄S: 536,2 - gef. 537,4 [M+H]⁺.

762a) Bzls-D-hAla(4-Pyr)-Glu-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

762b) Bzls-hAla(4-Pyr)-Glu-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

50 mg (0,11 mmol) Bzls-D,L-hAla(4-Pyr)-OH x TFA (**19**) und 51 mg (0,11 mmol) H-Glu(OBzl)-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x HCl (**4b**) wurden nach *Vorschrift F* gekoppelt. Das erhaltene Zwischenprodukt wurde für 48 h bei 50 °C nach *Vorschrift E¹* hydriert und die Diastereomere mittels RP-HPLC getrennt.

Ausbeute **762a**: 11 mg (0,013 mmol, 12 %) weißer Feststoff, HPLC: 23,7 % B, MS: ber. für C₂₉H₃₄N₆O₆S: 594,2 - gef. 595,8 [M+H]⁺.

Ausbeute **762b**: 9 mg (0,011 mmol, 10 %) weißer Feststoff, HPLC: 24,3 % B, MS: ber. für C₂₉H₃₄N₆O₆S: 594,2 - gef. 595,8 [M+H]⁺.

761a) Bzls-D-hAla(4-Pyr)-Glu(OBzl)-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

761b) Bzls-hAla(4-Pyr)-Glu(OBzl)-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

Die Hydrierung zur Synthese der Verbindung **762** verlief nicht vollständig, daher wurde bei der Reinigung der Produkte über präparative RP-HPLC als Nebenprodukte zusätzlich die Verbindungen **761a** und **761b** erhalten.

Ausbeute **761a**: 12,5 mg (0,014 mmol, 13 %) weißer Feststoff, HPLC: 36,1 % B, MS: ber. für C₃₆H₄₀N₆O₆S: 684,3 - gef. 685,5 [M+H]⁺.

Ausbeute **761b**: 10 mg (0,011 mmol, 10 %) weißer Feststoff, HPLC: 38,1 % B, MS: ber. für C₃₆H₄₀N₆O₆S: 684,3 - gef. 685,5 [M+H]⁺.

763) Bzls-D-hTyr-Glu(OEt)-4-Amidinobenzylamid x TFA

50 mg (0,143 mmol) Bzls-D-hTyr-OH (**18**) und 57,4 mg (0,143 mmol) H-Glu(OEt)-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x HCl (**5c**) wurden nach *Vorschrift F* gekoppelt. Das entstandene Zwischenprodukt wurde nach *Vorschrift E¹* hydriert und gereinigt.

Ausbeute: 57 mg (0,076 mmol, 53 %) weißer Feststoff, HPLC: 39,3 % B, MS: ber. für C₃₂H₃₉N₅O₇S: 637,3 - gef. 638,5 [M+H]⁺.

771) Bzls-D-hTyr-Glu(OEt)-4-Hydroxyamidinobenzylamid x TFA

139 mg (0,4 mmol) Bzls-D-hTyr-OH (**18**) und 159 mg (0,4 mmol) H-Glu(OEt)-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x HCl (**5c**) wurden nach *Vorschrift F* gekoppelt. Das entstandene Zwischenprodukt wurde in 12 ml DMF gelöst, mit 3 ml Piperidin versetzt und über Nacht bei RT geschüttelt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum eingeeengt, der Rückstand über präparative RP-HPLC gereinigt und das Produkt aus 80 % *tert.*-Butanol lyophilisiert.

Ausbeute: 185 mg (0,28 mmol, 70 %) weißer Feststoff, HPLC: 40,2 % B, MS: ber. für C₃₂H₃₉N₅O₈S: 653,3 - gef. 654,8 [M+H]⁺.

764) 4-NO₂-Bzls-D-Ser(tBu)-Gly-4-Amidinobenzylamid x TFA

90 mg (0,25 mmol) 4-NO₂-Bzls-D-Ser(tBu)-OH (**30**) wurden mit 75,2 mg (0,25 mmol) H-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl (**2c**) nach *Vorschrift F¹* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 132,5 mg (0,2 mmol, 80 %) weißer Feststoff, HPLC: 39,0 % B, MS: ber. für C₂₄H₃₂N₆O₇S: 548,2 - gef. 549,3 [M+H]⁺.

765) 4-NO₂-Bzls-D-Ser-Gly-4-Amidinobenzylamid x TFA

9 mg (0,014 mmol) Verbindung **764** wurden nach *Vorschrift C¹* umgesetzt.

Ausbeute: 8 mg (0,013 mmol, 93 %) weißer Feststoff, HPLC: 27,1 % B, MS: ber. für C₂₀H₂₄N₆O₇S: 492,2 - gef. 493,7 [M+H]⁺.

766) 4-NH₂-Bzls-D-Ser(tBu)-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

66 mg (0,1 mmol) Verbindung **764** wurden 5 h nach *Vorschrift E¹* hydriert und gereinigt.

Ausbeute: 50 mg (0,067 mmol, 67 %) weißer Feststoff, HPLC: 24,2 % B, MS: ber. für C₂₄H₃₄N₆O₅S: 518,2 - gef. 519,3 [M+H]⁺.

767) 4-NH₂-Bzls-D-Ser-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

11,5 mg (0,015 mmol) Verbindung **766** wurden nach *Vorschrift C¹* umgesetzt.

Ausbeute: 10 mg (0,014 mmol, 93 %) weißer Feststoff, HPLC: 14,0 % B, MS: ber. für C₂₀H₂₆N₆O₅S: 462,2 - gef. 463,5 [M+H]⁺.

768) Bzls-D-hPhe-Glu-4-Amidinobenzylamid x TFA

43 mg (0,13 mmol) Bzls-D-hPhe-OH (**17**) und 60 mg (0,13 mmol) H-Glu(OBzl)-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x HCl (**4b**) wurden nach *Vorschrift F* gekoppelt. Das entstandene Zwischenprodukt wurde nach *Vorschrift E¹* hydriert und gereinigt.

Ausbeute: 50 mg (0,07 mmol, 54 %) weißer Feststoff, HPLC: 40,7 % B, MS: ber. für C₃₀H₃₅N₆O₅S: 593,2 - gef. 594,7 [M+H]⁺.

769) 3-NH₂-Bzls-D-hPhe-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

63 mg (0,17 mmol) 3-NO₂-Bzls-D-hPhe-OH (**27c**) und 50 mg (0,17 mmol) H-Gly-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x HCl (**2b**) wurden nach *Vorschrift F* gekoppelt. Das entstandene Zwischenprodukt wurde nach *Vorschrift E¹* hydriert und gereinigt.

Ausbeute: 56 mg (0,073 mmol, 43 %) weißer Feststoff, HPLC: 28,3 % B, MS: ber. für C₂₇H₃₂N₆O₄S: 536,2 - gef. 537,5 [M+H]⁺.

770) 4-NH₂-Bzls-D-hTyr-Glu-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

42,6 mg (0,11 mmol) 4-NO₂-Bzls-D-hTyr-OH (**31**) und 50 mg (0,11 mmol) H-Glu(OBzl)-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x HCl (**4b**) wurden nach *Vorschrift F* gekoppelt. Das entstandene Zwischenprodukt wurde nach *Vorschrift E¹* hydriert und gereinigt.

Ausbeute: 35 mg (0,041 mmol, 37 %) weißer Feststoff, HPLC: 22,5 % B, MS: ber. für C₃₀H₃₆N₆O₇S: 624,2 - gef. 625,7 [M+H]⁺.

773) 4-NO₂-Bzls-D-hTyr-Gly-4-Amidinobenzylamid x TFA

97 mg (0,25 mmol) 4-NO₂-Bzls-D-hTyr-OH (**31**) und 75 mg (0,25 mmol) H-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl (**2c**) wurden nach *Vorschrift F^I* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 80 mg (0,12 mmol, 48 %) weißer Feststoff, HPLC: 35,3 % B, MS: ber. für C₂₇H₃₀N₆O₇S: 582,2 - gef. 583,9 [M+H]⁺.

774) 4-NH₂-Bzls-D-hTyr-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

65 mg (0,093 mmol) **CJ-773** wurden 5 h nach *Vorschrift E^I* hydriert und gereinigt.

Ausbeute: 48 mg (0,061 mmol, 66 %) weißer Feststoff, HPLC: 21,9 % B, MS: ber. für C₂₇H₃₂N₆O₅S: 552,2 - gef. 553,7 [M+H]⁺.

775) 3-NO₂-Bzls-D-hPhe-Glu(OtBu)-4-Amidinobenzylamid x TFA

42 mg (0,11 mmol) 3-NO₂-Bzls-D-hPhe-OH (**27c**) und 50 mg (0,11 mmol) H-Glu(OtBu)-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl (**6b**) wurden nach *Vorschrift F^I* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 55 mg (0,07 mmol, 64 %) weißer Feststoff, HPLC: 52,2 % B, MS: ber. für C₃₄H₄₂N₆O₉S: 694,3 - gef. 695,7 [M+H]⁺.

776) 3-NO₂-Bzls-D-hPhe-Glu-4-Amidinobenzylamid x TFA

40 mg (0,05 mmol) Verbindung **775** wurden nach *Vorschrift C^I* umgesetzt.

Ausbeute: 30 mg (0,04 mmol, 80 %) weißer Feststoff, HPLC: 39,4 % B, MS: ber. für C₃₀H₃₄N₆O₈S: 638,2 - gef. 639,8 [M+H]⁺.

777) 4-NO₂-Bzls-D-hTyr-Glu(OtBu)-4-Amidinobenzylamid x TFA

50 mg (0,13 mmol) 4-NO₂-Bzls-D-hTyr-OH (**31**) und 58 mg (0,13 mmol) H-Glu(OtBu)-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl (**6b**) wurden nach *Vorschrift F^I* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 86 mg (0,1 mmol, 77 %) weißer Feststoff, HPLC: 43,2 % B, MS: ber. für C₃₄H₄₂N₆O₉S: 710,3 - gef. 711,5 [M+H]⁺.

778) 4-NO₂-Bzls-D-hTyr-Glu-4-Amidinobenzylamid x TFA

35 mg (0,04 mmol) Verbindung **777** wurden nach *Vorschrift C^I* umgesetzt.

Ausbeute: 30 mg (0,04 mmol, 99 %) weißer Feststoff, HPLC: 33,9 % B, MS: ber. für C₃₀H₃₄N₆O₉S: 654,2 - gef. 653,5 [M+H]⁺.

781a) 4-NO₂-Bzls-D-hAla(4-Pyr)-Glu(OtBu)-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

781b) 4-NO₂-Bzls-hAla(4-Pyr)-Glu(OtBu)-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

60 mg (0,16 mmol) 4-NO₂-Bzls-D,L-hAla(4-Pyr)-OH x TFA (**32**) und 73 mg (0,16 mmol) H-Glu(OtBu)-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl (**6b**) wurden nach *Vorschrift F^I* gekoppelt und die Diastereomere mittels RP-HPLC getrennt.

Ausbeute **781a**: 43 mg (0,05 mmol, 31 %) weißer Feststoff, HPLC: 33,6 % B, MS: ber. für C₃₃H₄₁N₇O₈S: 695,3 - gef. 696,6 [M+H]⁺.

Ausbeute **781b**: 12 mg (0,014 mmol, 7 %) weißer Feststoff, HPLC: 35,9 % B, MS: ber. für C₃₃H₄₁N₇O₈S: 695,3 - gef. 696,6 [M+H]⁺.

782a) 4-NO₂-Bzls-D-hAla(4-Pyr)-Glu-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

37 mg (0,04 mmol) Verbindung **781a** wurden nach *Vorschrift C^I* umgesetzt.

Ausbeute: 22 mg (0,025 mmol, 63 %) weißer Feststoff, HPLC: 24,8 % B, MS: ber. für C₂₉H₃₃N₇O₈S: 639,2 - gef. 640,8 [M+H]⁺.

782b) 4-NO₂-Bzls-hAla(4-Pyr)-Glu-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

9,4 mg (0,01 mmol) Verbindung **781b** wurden nach *Vorschrift C^I* umgesetzt.

Ausbeute: 9,2 mg (0,01 mmol, 99 %) weißer Feststoff, HPLC: 25,6 % B, MS: ber. für C₂₉H₃₃N₇O₈S: 639,2 - gef. 640,8 [M+H]⁺.

783a) 4-NH₂-Bzls-D-hAla(4-Pyr)-Glu-4-Amidinobenzylamid x 3 TFA

5 mg (0,006 mmol) Verbindung **782a** wurden 5 h nach *Vorschrift E^I* hydriert und gereinigt.

Ausbeute: 2,5 mg (0,003 mmol, 50 %) weißer Feststoff, HPLC: 15,4 % B, MS: ber. für C₂₉H₃₅N₇O₆S: 609,2 - gef. 610,7 [M+H]⁺.

783b) 4-NH₂-Bzls-hAla(4-Pyr)-Glu-4-Amidinobenzylamid x 3 TFA

5 mg (0,006 mmol) Verbindung **782b** wurden 5 h nach *Vorschrift E^I* hydriert und gereinigt.

Ausbeute: 1,7 mg (0,002 mmol, 33 %) weißer Feststoff, HPLC: 15,6 % B, MS: ber. für C₂₉H₃₅N₇O₆S: 609,2 - gef. 610,7 [M+H]⁺.

784) Bzls-D-Phe(4-NO₂)-Gly-4-Amidinobenzylamid x TFA

80 mg (0,23 mmol) Bzls-D-Phe(4-NO₂)-OH (**22**) und 65 mg (0,23 mmol) H-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl (**2c**) wurden nach *Vorschrift F^I* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 92 mg (0,14 mmol, 61 %) weißer Feststoff, HPLC: 37,3 % B, MS: ber. für C₂₆H₂₈N₆O₆S: 552,2 - gef. 552,8 [M+H]⁺.

785) Bzls-D-Phe(4-NH₂)-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

38 mg (0,06 mmol) Verbindung **784** wurden 5 h nach *Vorschrift E^I* hydriert und gereinigt.

Ausbeute: 27,7 mg (0,04 mmol, 67 %) weißer Feststoff, HPLC: 23,3 % B, MS: ber. für C₂₆H₃₀N₆O₄S: 522,2 - gef. 523,7 [M+H]⁺.

786) 4-NO₂-Bzls-D,L-hAla(4-Pyr)-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

60 mg (0,16 mmol) 4-NO₂-Bzls-D,L-hAla(4-Pyr)-OH x TFA (**32**) und 45 mg (0,16 mmol) H-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl (**2c**) wurden nach *Vorschrift F^I* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 62 mg (0,08 mmol, 50 %) weißer Feststoff, HPLC: 24,8 % B, MS: ber. für C₂₆H₂₉N₇O₆S: 567,2 - gef. 568,7 [M+H]⁺.

787) 4-NH₂-Bzls-D,L-hAla(4-Pyr)-Gly-4-Amidinobenzylamid x 3 TFA

10 mg (0,015 mmol) Verbindung **786** wurden 5 h nach *Vorschrift E^I* hydriert und gereinigt.

Ausbeute: 12 mg (0,014 mmol, 93 %) weißer Feststoff, HPLC: 13,9 % B, MS: ber. für C₂₆H₃₁N₇O₄S: 537,2 - gef. 538,6 [M+H]⁺.

796) 4-(MeOOCCH₂)Bzls-D,L-hAla(4-Pyr)-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

70 mg (0,15 mmol) H-D,L-hAla(4-Pyr)-Gly-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x 2 HCl (**13b**) und 45 mg (0,17 mmol) 4-(MeOOCCH₂)Bzls-Cl (**33c**) wurden nach *Vorschrift H* gekoppelt, aber nicht gewaschen. Das entstandene Zwischenprodukt wurde nach *Vorschrift E^I* hydriert und gereinigt.

Ausbeute: 41,5 mg (0,05 mmol, 33 %) weißer Feststoff, HPLC: 24,3 % B, MS: ber. für C₂₉H₃₄N₆O₆S: 594,2 - gef. 595,9 [M+H]⁺.

797) 4-(HOOCCH₂)Bzls-D,L-hAla(4-Pyr)-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

15 mg (0,02 mmol) Verbindung **796** wurden nach *Vorschrift O* verseift.

Ausbeute: 8 mg (0,01 mmol, 50 %) weißer Feststoff, HPLC: 19,9 % B, MS: ber. für C₂₈H₃₂N₆O₆S: 580,2 - gef. 581,8 [M+H]⁺.

1703a) Bzls-D-hAla(4-Pyr)-Glu(NH-Bzl)-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

1703b) Bzls-hAla(4-Pyr)-Glu(NH-Bzl)-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

72,4 mg (0,22 mmol) Bzls-D,L-hAla(4-Pyr)-OH x TFA (**19**) und 100 mg (0,22 mmol) H-Glu(NH-Bzl)-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x HCl (**7c**) wurden nach *Vorschrift F* gekoppelt. Das entstandene Zwischenprodukt wurde nach *Vorschrift E¹* hydriert und die Diastereomere mittels RP-HPLC getrennt.

Ausbeute **1703a**: 43,4 mg (0,05 mmol, 23 %) weißer Feststoff, HPLC: 20,3 % B, MS: ber. für C₃₆H₄₁N₇O₅S: 583,3 - gef. 584,9 [M+H]⁺.

Ausbeute **1703b**: 35 mg (0,04 mmol, 18 %) weißer Feststoff, HPLC: 21,8 % B, MS: ber. für C₃₆H₄₁N₇O₅S: 583,3 - gef. 584,9 [M+H]⁺.

1704a) Bzls-D-hAla(4-Pyr)-Ala(PhEt)-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

1704b) Bzls-hAla(4-Pyr)-Ala(PhEt)-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

40 mg (0,12 mmol) Bzls-D,L-hAla(4-Pyr)-OH x TFA (**19**) und 50 mg (0,12 mmol) H-Styrylalanyl-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x HCl (**8b**) wurden nach *Vorschrift F* gekoppelt. Das entstandene Zwischenprodukt wurde nach *Vorschrift E¹* hydriert und die Diastereomere mittels RP-HPLC getrennt.

Ausbeute **1704a**: 20 mg (0,024 mmol, 20 %) weißer Feststoff, HPLC: 34,4 % B, MS: ber. für C₃₅H₄₀N₆O₄S: 540,3 - gef. 541,7 [M+H]⁺.

Ausbeute **1704b**: 13 mg (0,016 mmol, 13 %) weißer Feststoff, HPLC: 36,3 % B, MS: ber. für C₃₅H₄₀N₆O₄S: 540,3 - gef. 541,7 [M+H]⁺.

1705) Bzls-D,L-hAla(3-Pyr)-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

81 mg (0,18 mmol) Bzls-D,L-hAla(3-Pyr)-OH x TFA (**20**) und 50 mg (0,18 mmol) H-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl (**2c**) wurden nach *Vorschrift F¹* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 82,5 mg (0,11 mmol, 61 %) weißer Feststoff, HPLC: 22,3 % B, MS: ber. für C₂₆H₃₀N₆O₄S: 522,2 - gef. 523,2 [M+H]⁺.

1706a) Bzls-D-hAla(3-Pyr)-Glu-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

1706b) Bzls-hAla(3-Pyr)-Glu-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

36 mg (0,11 mmol) Bzls-D,L-hAla(3-Pyr)-OH x TFA (**20**) und 50 mg (0,11 mmol) H-Glu(OBzl)-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x HCl (**4b**) wurden nach *Vorschrift F* gekoppelt. Das entstandene Zwischenprodukt wurde für 48 h bei 50 °C nach *Vorschrift E¹* hydriert und die Diastereomere mittels RP-HPLC getrennt.

Ausbeute **1706a**: 18 mg (0,02 mmol, 19 %) weißer Feststoff, HPLC: 22,5 % B, MS: ber. für C₂₉H₃₄N₆O₆S: 594,2 - gef. 595,9 [M+H]⁺.

Ausbeute **1706b**: 16 mg (0,018 mmol, 17 %) weißer Feststoff, HPLC: 23,1 % B, MS: ber. für C₂₉H₃₄N₆O₆S: 594,2 - gef. 595,9 [M+H]⁺.

1707) Bzls-D,L-hAla(2-Pyr)-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

74 mg (0,164 mmol) Bzls-D,L-hAla(2-Pyr)-OH x TFA (**21**) und 46 mg (0,164 mmol) H-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl (**2c**) wurden nach *Vorschrift F¹* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 53 mg (0,07 mmol, 43%) weißer Feststoff, HPLC: 22,4 % B, MS: ber. für C₂₆H₃₀N₆O₄S: 522,2 - gef. 523,2 [M+H]⁺.

1708) Bzls-D-hAla(4-Pyr)-Pro-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

1709) Bzls-hAla(4-Pyr)-Pro-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

85 mg (0,254 mmol) Bzls-D,L-hAla(4-Pyr)-OH x TFA (**19**) und 98 mg (0,254 mmol) H-Pro-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x 2 HBr (**9b**) wurden nach *Vorschrift F* gekoppelt. Das entstandene Zwischenprodukt wurde für 48 h bei 50 °C nach *Vorschrift E¹* hydriert und die Diastereomere mittels RP-HPLC getrennt.

Ausbeute **1708**: 51 mg (0,06 mmol, 24,5 %) weißer Feststoff, HPLC: 25,1 % B, MS: ber. für C₂₉H₃₄N₆O₄S: 562,2 - gef. 563,9 [M+H]⁺.

Ausbeute **1709**: 38 mg (0,05 mmol, 18,5 %) weißer Feststoff, HPLC: 25,7 % B, MS: ber. für C₂₉H₃₄N₆O₄S: 562,2 - gef. 563,9 [M+H]⁺.

1719) Bzls-D-Ser(tBu)-D-hAla(3-Pyr)-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

1720) Bzls-D-Ser(tBu)-hAla(3-Pyr)-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

71,3 mg (0,23 mmol) Bzls-D-Ser(tBu)-OH (**15**) und 100 mg (0,23 mmol) H-D,L-hAla(3-Pyr)-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x 2 HCl (**10c**) wurden nach *Vorschrift F* gekoppelt. Das entstandene Zwischenprodukt wurde nach *Vorschrift P* reduziert und die Diastereomere mittels RP-HPLC getrennt.

Ausbeute **1719**: 32 mg (0,038 mmol, 17 %) weißer Feststoff, HPLC: 31,4 % B, MS: ber. für C₃₁H₄₀N₆O₅S: 608,3 - gef. 609,8 [M+H]⁺.

Ausbeute **1720**: 30 mg (0,036 mmol, 16 %) weißer Feststoff, HPLC: 31,8 % B, MS: ber. für C₃₁H₄₀N₆O₅S: 608,3 - gef. 609,8 [M+H]⁺.

1723) Bzls-D-Ser-D-hAla(3-Pyr)-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

9 mg (0,01 mmol) Verbindung **1719** wurden nach *Vorschrift C^l* umgesetzt.

Ausbeute: 7,8 mg (0,01 mmol, 99 %) weißer Feststoff, HPLC: 22,1 % B, MS: ber. für C₂₇H₃₂N₆O₅S: 552,2 - gef. 553,8 [M+H]⁺.

1724) Bzls-D-Ser-hAla(3-Pyr)-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

11 mg (0,013 mmol) Verbindung **1720** wurden nach *Vorschrift C^l* umgesetzt.

Ausbeute: 10 mg (0,013 mmol, 99 %) weißer Feststoff, HPLC: 22,8 % B, MS: ber. für C₂₇H₃₂N₆O₅S: 552,2 - gef. 553,8 [M+H]⁺.

1721) Bzls-D-Ser(tBu)-D-hAla(4-Pyr)-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

1722) Bzls-D-Ser(tBu)-hAla(4-Pyr)-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

71,3 mg (0,23 mmol) Bzls-D-Ser(tBu)-OH (**15**) und 100 mg (0,23 mmol) H-D,L-hAla(4-Pyr)-4-Acetylhydroxyamidinobenzylamid x 2 HCl (**11c**) wurden nach *Vorschrift F* gekoppelt. Das entstandene Zwischenprodukt wurde nach *Vorschrift P* reduziert und die Diastereomere mittels RP-HPLC getrennt.

Ausbeute **1721**: 28 mg (0,033 mmol, 15 %) weißer Feststoff, HPLC: 31,3 % B, MS: ber. für C₃₁H₄₀N₆O₅S: 608,3 - gef. 609,8 [M+H]⁺.

Ausbeute **1722**: 20 mg (0,024 mmol, 10 %) weißer Feststoff, HPLC: 31,7 % B, MS: ber. für C₃₁H₄₀N₆O₅S: 608,3 - gef. 609,8 [M+H]⁺.

1725) Bzls-D-Ser-D-hAla(4-Pyr)-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

9,5 mg (0,011 mmol) Verbindung **1721** wurden nach *Vorschrift C^l* umgesetzt.

Ausbeute: 8,6 mg (0,011 mmol, 99 %) weißer Feststoff, HPLC: 22,0 % B, MS: ber. für C₂₇H₃₂N₆O₅S: 552,2 - gef. 553,8 [M+H]⁺.

1726) Bzls-D-Ser-hAla(4-Pyr)-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

11 mg (0,013 mmol) Verbindung **1722** wurden nach *Vorschrift C^l* umgesetzt.

Ausbeute: 10 mg (0,013 mmol, 99 %) weißer Feststoff, HPLC: 22,7 % B, MS: ber. für C₂₇H₃₂N₆O₅S: 552,2 - gef. 553,8 [M+H]⁺.

1211) Bzls-D,L-hAla(4-Pyr-NO)-Gly-4-Amidinobenzylamid x TFA

30 mg (0,073 mmol) Bzls-D,L-hAla(4-Pyr-NO)-Gly-OH (**37c**) und 15 mg (0,073 mmol) H-4-Amidinobenzylamin x 2 HCl (**1f**) wurden nach *Vorschrift F^l* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 27 mg (0,041 mmol, 56 %) weißer Feststoff, HPLC: 23,5 % B, MS: ber. für C₂₆H₃₀N₆O₅S: 538,2 - gef. 539,2 [M+H]⁺.

1710) Bzls-D,L-hAla(3-Pyr-NO)-Gly-4-Amidinobenzylamid x TFA

93 mg (0,23 mmol) Bzls-D,L-hAla(3-Pyr-NO)-Gly-OH (**38c**) und 51 mg (0,23 mmol) H-4-Amidinobenzylamin x 2 HCl (**1f**) wurden nach *Vorschrift F^l* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 90 mg (0,14 mmol, 61 %) weißer Feststoff, HPLC: 24,0 % B, MS: ber. für C₂₆H₃₀N₆O₅S: 538,2 - gef. 539,2 [M+H]⁺.

1215) Bzls-D,L-hAla(2-Pyr-NO)-Gly-4-Amidinobenzylamid x TFA

18,6 mg (0,046 mmol) Bzls-D,L-hAla(2-Pyr-NO)-Gly-OH (**39c**) und 11 mg (0,046 mmol) H-4-Amidinobenzylamin x 2 HCl (**1f**) wurden nach *Vorschrift F^l* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 19,3 mg (0,03 mmol, 65 %) weißer Feststoff, HPLC: 25,1 % B, MS: ber. für C₂₆H₃₀N₆O₅S: 538,2 - gef. 539,2 [M+H]⁺.

1715) Bzls-D,L-hAla(2-Pyr-NO)-Gly-4-Hydroxyamidinobenzylamid x TFA

34,6 mg (0,085 mmol) Bzls-D,L-hAla(2-Pyr-NO)-Gly-OH (**39c**) und 14,4 mg (0,085 mmol) 4-Cyanobenzylamin x HCl wurden nach *Vorschrift F* gekoppelt. Das entstandene Zwischenprodukt wurde nach *Vorschrift L* mit Hydroxylamin umgesetzt. Es wurden zusätzlich 12 mg (0,17 mmol) Hydroxylamin x HCl und 30 µl (0,017 mmol) DIEA nachdosiert. Der Rückstand wurde über präparative RP-HPLC gereinigt und das Produkt aus Wasser lyophilisiert.

Ausbeute: 18 mg (0,032 mmol, 38 %) weißer Feststoff, HPLC: 25,2 % B, MS: ber. für C₂₉H₃₄N₆O₄S: 554,2 - gef. 555,7 [M+H]⁺.

1307) 4-(NO)Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-Gly-4-Amidinobenzylamid x TFA

16,4 mg (0,04 mmol) 4-(NO)Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-Gly-OH (**40c**) und 9 mg (0,04 mmol) H-4-Amidinobenzylamin x 2 HCl (**1f**) wurden nach *Vorschrift F^l* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 19,6 mg (0,03 mmol, 75 %) weißer Feststoff, HPLC: 27,0 % B, MS: ber. für C₂₆H₃₀N₆O₅S: 538,2 - gef. 539,2 [M+H]⁺.

1711) 3-(NO)Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-Gly-4-Amidinobenzylamid x TFA

122 mg (0,3 mmol) 3-(NO)Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-Gly-OH (**41c**) und 67 mg (0,3 mmol) H-4-Amidinobenzylamin x 2 HCl (**1f**) wurden nach *Vorschrift F^l* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 89 mg (0,14 mmol, 47 %) weißer Feststoff, HPLC: 27,3 % B, MS: ber. für C₂₆H₃₀N₆O₅S: 538,2 - gef. 539,2 [M+H]⁺.

1217) 2-(NO)Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-Gly-4-Amidinobenzylamid x TFA

11 mg (0,027 mmol) 2-(NO)Pyridylmethylsulfonyl-D-hPhe-Gly-OH (**42c**) und 7 mg (0,027 mmol) H-4-Amidinobenzylamin x 2 HCl (**1f**) wurden nach *Vorschrift F^l* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 10,3 mg (0,018 mmol, 67 %) weißer Feststoff, HPLC: 25,0 % B, MS: ber. für C₂₆H₃₀N₆O₅S: 538,2 - gef. 539,2 [M+H]⁺.

1728) Bzls-hAla(2-Pyr)-Pro-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

1729) Bzls-D-hAla(2-Pyr)-Pro-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

17,4 mg (0,04 mmol) Bzls-D,L-hAla(2-Pyr)-OH x TFA (**21**) und 13 mg (0,04 mmol) H-Pro-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl (**9c**) wurden nach *Vorschrift F^l* gekoppelt und die Diastereomere mittels RP-HPLC getrennt.

Ausbeute **1728**: 10 mg (0,013 mmol, 32 %) weißer Feststoff, HPLC: 25,7 % B, MS: ber. für C₂₉H₃₄N₆O₄S: 562,2 - gef. 563,9 [M+H]⁺.

Ausbeute **1729**: 10 mg (0,013 mmol, 32 %) weißer Feststoff, HPLC: 24,9 % B, MS: ber. für C₂₉H₃₄N₆O₄S: 562,2 - gef. 563,9 [M+H]⁺.

1732) Bzls-hAla(3-Pyr)-Pro-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

1733) Bzls-D-hAla(3-Pyr)-Pro-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

25 mg (0,06 mmol) Bzls-D,L-hAla(3-Pyr)-OH x TFA (**20**) und 18 mg (0,06 mmol) H-Pro-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl (**9c**) wurden nach *Vorschrift F^l* gekoppelt und die Diastereomere mittels RP-HPLC getrennt.

Ausbeute **1732**: 8 mg (0,01 mmol, 17 %) weißer Feststoff, HPLC: 25,5 % B, MS: ber. für C₂₉H₃₄N₆O₄S: 562,2 - gef. 563,9 [M+H]⁺.

Ausbeute **1733**: 10 mg (0,013 mmol, 21 %) weißer Feststoff, HPLC: 25,0 % B, MS: ber. für C₂₉H₃₄N₆O₄S: 562,2 - gef. 563,9 [M+H]⁺.

Verbindungen nach Racemattrennung

Die zur Synthese der folgenden Inhibitoren verwendeten D- und L-Derivate der wurden aus den racematgetrennten D- bzw. L-Aminosäuren (vgl. Kapitel 5.6.7.) in Analogie zu den Synthesevorschriften der Racemate hergestellt und werden im Folgenden mit den selben Nummern und dem Zusatz „D-“ bzw. „L-“ bezeichnet. So werden z.B. für die mit „**20**“ bezeichnete Verbindung Bzls-D,L-hAla(2-Pyr)-OH x TFA die entsprechenden Derivate Bzls-D-hAla(2-Pyr)-OH x TFA mit „**D-20**“ und Bzls-hAla(2-Pyr)-OH x TFA mit „**L-20**“ gekennzeichnet.

1727) Bzls-hAla(2-Pyr)-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

25 mg (0,06 mmol) Bzls-hAla(2-Pyr)-OH x TFA (**L-21**) und 18 mg (0,06 mmol) H-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl (**2c**) wurden nach *Vorschrift F^l* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 17,9 mg (0,024 mmol, 40 %) weißer Feststoff, HPLC: 22,2 % B, MS: ber. für C₂₆H₃₀N₆O₄S: 522,2 - gef. 523,2 [M+H]⁺.

1730) Bzls-D-hAla(2-Pyr)-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

25 mg (0,06 mmol) Bzls-D-hAla(2-Pyr)-OH x TFA (**D-21**) und 18 mg (0,06 mmol) H-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl (**2c**) wurden nach *Vorschrift F^l* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 27 mg (0,036 mmol, 60 %) weißer Feststoff, HPLC: 22,4 % B, MS: ber. für C₂₆H₃₀N₆O₄S: 522,2 - gef. 523,2 [M+H]⁺.

1731) Bzls-hAla(3-Pyr)-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

25 mg (0,06 mmol) Bzls-hAla(3-Pyr)-OH x TFA (**L-20**) und 18 mg (0,06 mmol) H-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl (**2c**) wurden nach *Vorschrift F^l* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 30 mg (0,04 mmol, 67 %) weißer Feststoff, HPLC: 22,2 % B, MS: ber. für C₂₆H₃₀N₆O₄S: 522,2 - gef. 523,2 [M+H]⁺.

1734) Bzls-D-hAla(3-Pyr)-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

25 mg (0,06 mmol) Bzls-D-hAla(3-Pyr)-OH x TFA (**D-20**) und 18 mg (0,06 mmol) H-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 HCl (**2c**) wurden nach *Vorschrift F^l* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 13 mg (0,02 mmol, 33 %) weißer Feststoff, HPLC: 22,2 % B, MS: ber. für C₂₆H₃₀N₆O₄S: 522,2 - gef. 523,2 [M+H]⁺.

1332) Bzls-D-hAla(2-Pyr-NO)-Gly-4-Amidinobenzylamid x TFA

506 mg (1,24 mmol) Bzls-D-hAla(2-Pyr-NO)-Gly-OH (**D-39c**) und 276 mg (1,24 mmol) H-4-Amidinobenzylamin x 2 HCl (**1f**) wurden nach *Vorschrift F^l* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 392 mg (0,6 mmol, 48 %) weißer Feststoff, HPLC: 25,1 % B, MS: ber. für C₂₆H₃₀N₆O₅S: 538,2 - gef. 539,2 [M+H]⁺.

1331) Bzls-D-hAla(2-Pyr-NO)-Gly-4-Hydroxyamidinobenzylamid x AcOH

2,08 g (2,95 mmol) Bzls-D-hAla(2-Pyr-NO)-Gly-OH (**D-39c**) und 1,17 g (2,95 mmol) H-4-Hydroxyamidinobenzylamin x 2 TFA (**1g**) wurden nach *Vorschrift F^l* gekoppelt und über Ionenaustauschchromatographie (Fractogel[®] EMD COO-, 16 x 130 mm) gereinigt.

Ausbeute: 1,43 g (2,33 mmol, 79 %) weißer Feststoff, HPLC: 25,1 % B, MS: ber. für C₂₆H₃₀N₆O₅S: 554,2 - gef. 555,7 [M+H]⁺. ¹H NMR, 300,13 MHz, 5 % CH₃COOH in D₂O, σ ppm: 8,31 d, ³J{HH} = 6,3 Hz, 1H; 7,64, dd ³J{HH} = 7,9 Hz, ³J{HH} = 7,4 Hz, 1H; 7,56 d ³J{HH} = 8,3 Hz, 2H; 7,48 dd ³J{HH} = 7,6 Hz, ³J{HH} = 6,3 Hz, 1H; 7,44 d ³J{HH} = 8,3 Hz, 2H; 7,40 m 6H; 4,48 s 2H; 4,43 s 2H; 3,96 s 2H; 3,82 t ³J{HH} = 6,9 Hz, 1H; 2,92 m 2H. Die zweite Methylengruppe der Homoaminosäure wurde vom Signal der Essigsäure überdeckt, die zur Steigerung der Löslichkeit zugesetzt werden musste. ¹³C NMR, 75,48 MHz, 5 % CH₃COOH in D₂O, σ ppm: 174,34; 171,67; 161,19; 151,01; 144,36; 139,97; 132,23; 131,15; 129,42; 129,25; 128,66; 128,37, 128,02; 127,58; 125,59; 124,10; 59,19; 57,14; 43,22; 42,97; 29,33; 26,84.

1741) Bzls-hAla(2-Pyr-NO)-Gly-4-Amidinobenzylamid x TFA

90 mg (0,22 mmol) Bzls-hAla(2-Pyr-NO)-Gly-OH (**L-39c**) und 50 mg (0,22 mmol) H-4-Amidinobenzylamin x 2 HCl (**1f**) wurden nach *Vorschrift F^l* gekoppelt und gereinigt.

Ausbeute: 71,4 mg (0,11 mmol, 50 %) weißer Feststoff, HPLC: 24,9 % B, MS: ber. für C₂₆H₃₀N₆O₅S: 538,2 - gef. 539,2 [M+H]⁺.

6. Literatur

Adler, M., Kochanny, M.J., Ye, B., Rumennik, G., Light, D.R., Biancalana, S., Whitlow, M. (2002) Crystal Structures of Two Potent Nonamidine Inhibitors Bound to Factor Xa. *Biochemistry* **41**, 15514-15523.

Alexander, J.H., Yang, H., Becker, R.C., Kodama, K., Goodman, S., Dyke, C.K., Kleiman, N.S., Hochman, J.S., Berger, P.B., Cohen, E.A., Lincoff, A.M., Burton, J.R., Bovill, E.G., Kawai, C., Armstrong, P.w., Harrington, R.A. (2005) First experience with direct, selective factor Xa inhibition in patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes: results of the XaNADU-ACS Trial. *J. Thromb. Haemost.* **3**, 349-447.

Al-Obeidi, F., Ostrem, J.A. (1998) Factor Xa inhibitors by classical and combinatorial chemistry. *DDT* **3**, 223-231.

Al-Obeidi, F., Ostrem, J.A. (1999) Factor Xa inhibitors *Exp. Opin. Ther. Patents* **9**, 931-953.

Ames B., McCann J., Yamasaki E. (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research* **31**, 347-364.

Andreasen, P.A., Egelund, R., Petersen, H.H. (2000) The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 25-40.

Ansell, J., Hirsh, J., Dalen, J., Bussey, H., Anderson, D., Poller, L., Jacobson, A., Deykin, D., Matchar, D. (2001) Managing Oral Anticoagulant Therapy. *Chest* **119**, (Suppl.) 22S-38S.

Arnold, R.T., Dowdall, J.F. (1948) Preparation and Reactions of Methylene cyclohexane *J. Am. Chem. Soc.* **70**, 2590-2591.

Banner, D.W., D'Arcy, A., Chène, C., Winkler, F.K., Guha, A., Konigsberg, W.H., Nemerson, Y., Kirchhofer, D. (1996) the crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature* **380**, 41-46.

Batt, D.G., Qiao, J.X., Modi, D.P., Houghton, G.C., Pierson, D.A., Rossi, K.A., Luetgen, J.M., Knabb, R.M., Jadhav, P.K., Wexler, R.R. (2004) 5-Amidinoindoles as dual inhibitors of coagulation factors IXa and Xa. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 5269–5273.

Bauer, K.A. (2003) New Pentasaccharides for Prophylaxis of Deep Vein Thrombosis. *Chest* **124**, (Suppl.) 364S–370S.

Berkner, K.L. (2001) Blood Clotting: General Pathway. In: *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group, London, England, 1-7.

Bode, W., Mayr, I., Baumann, U., Huber, R., Stone, S.R. Hofsteenge, J. (1989): The refined 1.9 Å crystal structure of human α -thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment. *EMBO J.* **8**, 3467-3475.

Bode, W., Brandstetter, H., Mather, T., Stubbs M.T. (1997) Comparative analysis of haemostatic proteinases: structural aspects of thrombin, dactor Xa, factor IXa and Protein C. *Thromb. Haemost.* **78**, 501-511.

Booth, S.L., Saltzman, E. (2001) Vitamin K: Structure and Function. In: *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group, London, England, 1-7.

Brandstetter, H., Kuhne, A., Bode, W., Huber, R., vonderSaal, W., Wirthensohn, K., Engh, R.A. (1996) X-ray structure of active site-inhibited clotting factor Xa - Implications for drug design and substrate recognition. *J. Biol. Chem.* **271**, 29988-29992.

Bremner, D.H., Sturrock, K.R., Wishart, G., Mitchell, S.R., Nicoll, S.M., Jones, G. (1997a) A Comparison of Methods for N-Oxidation of some 3-substituted Pyridines. *Synth. Commun.* **27**, 1535-1542.

Bremner, D.H., Dunn, A.D., Wilson, K.A., Sturrock, K.R., Wishart, G. (1997b) The Synthesis of Thienopyridines from ortho-Halogenated Pyridine Derivatives; Part 2. *Synthesis*, 949-952.

Burgey, C.S., Robinson, K.A., Lyle, T.A., Nantermet, P.G., Selnick, H.G., Isaacs, R.C., Lewis, S.D., Lucas, B.J., Krueger, J.A., Singh, R., Miller-Stein, C., White, R.B., Wong, B., Lyle, E.A., Stranieri, M.T., Cook, J.J., McMasters, D.R., Pellicore, J.M., Pal, S., Wallace, A.A., Clayton, F.C., Bohn, D., Welsh, D.C., Lynch, J.J.Jr., Yan, Y., Chen, Z., Kuo, L., Gardell, S.J., Shafer, J.A., Vacca, J.P. (2003) Pharmacokinetic optimization of 3-amino-6-chloropyrazinone acetamide thrombin inhibitors. Implementation of P3 pyridine N-oxides to deliver an orally bioavailable series containing P1 N-benzylamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 1353-1357.

Cappello, M., Vlasuk, G.P., Bergum, P.W., Huang, S., Hotez, P.J. (1995) *Ancylostoma caninum* anticoagulant peptide: A hookworm-derived inhibitor of human coagulation factor Xa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6152-6156.

Chi, L., Peng, Y.W., Gibson, G., Hicks, G., Mertz, T.E., Rapundalo, S., Janiczek, N., Edmunds, J.J., Leadley R. (2004) In Vitro and In Vivo Antithrombotic Activity of PD-198961, a Novel Synthetic Factor Xa Inhibitor. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **44**, 493-500.

Choi-Sledeski, Y.M., Kearney, R., Poli, G., Pauls, H., Gardner, C., Gong, Y., Becker, M., Davis, R., Spada, A., Liang, G., Chu, V., Brown, K., Collussi, D., Leadley, R.Jr., Rebello, S., Moxey, P., Morgan, S., Bentley, R., Kasiewski, C., Maignan, S., Guilloteau, J.P., Mikol, V. (2003) Discovery of an Orally Efficacious Inhibitor of Coagulation Factor Xa Which Incorporates a Neutral P1 Ligand. *J. Med. Chem.* **46**, 681-684.

Chou, Y.L., Davey, D.D., Eagen, K.A., Griedel, B.D., Karanjawala, R., Phillips, G.B., Sacchi, K.L., Shaw, K.J., Wu, S.C., Lentz, D., Liang, A.M., Trinh, L., Morrissey, M.M., Kochanny, M.J. (2003) Structure-Activity Relationships of Substituted Benzothiophene-anthranilamide Factor Xa Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 507-511.

Clement, B., Lomb, R., Möller, W. (1997) Isolation and Characterization of the Protein Components of the Liver Microsomal O₂-insensitive NADH-Benzamidoxime Reductase. *J. Biol. Chem.* **272**, 19615-19620.

Coughlin, S.R. (2000) Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* **407**, 258-264.

Copéret, C., Adolfsson, H., Khuong T.A.V., Yudin, A.K., Sharpless, K.B. (1998) A Simple and Efficient Method for the Preparation of Pyridine *N*-Oxides *J. Org. Chem.* **63**, 1740-1741.

Davie, E. W., Fujikawa, K., Kisiel, W., (1991): The coagulation cascade: initiation, maintainance, and regulation. *Biochemistry* **30**, 10363-10370.

Deng, J.Z., Burgey, C.S., Rabbat, P.M.A., Lewis, S.D., Lucas, B.J., Krueger, J.A., White, R.B., Wong, B., Lyle, E.A., McMasters, D.R., Lynch, J.J., Yan, Y., Chen, Z., Kuo, L., Vacca, J.P., Lyle, T.A. (2003) Benzoxazole Thrombin and Factor Xa Inhibitors. 226th ACS National Meeting New York, USA, MEDI 80.

- Dixon, M. (1953) The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem. J.* **55**, 170-171.
- Doolittle, R.F. (2001) Fibrinogen and Fibrin. In: *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group, London, England, 1-7.
- Eckhardt, U., Stüber, W., Dickneite, G., Reers, M., Petzinger, E. (1996a) First-pass elimination of a peptidomimetic thrombin inhibitor is due to carrier mediated uptake by liver-interaction with bile acid transport systems. *Biochem. Pharmacol.* **52**, 85-96.
- Eckhardt, U., Horz, J.A., Petzinger, E., Stüber, W., Reers, M., Dickneite, G., Daniel, H., Wagener, M., Hagenbuch, B., Stieger, B., Meier, P.J. (1996b) The peptide-based thrombin inhibitor CRC 220 is a new substrate of the basolateral rat-liver organic anion-transporting polypeptide. *Hepatology* **24**, 380-384.
- Eriksson, U.G., Bredberg, U., Hoffmann, K.J., Thuresson, A., Gabrielsson, M., Ericsson, H., Anhoff, M., Gislén, K., Fager, G., Gustafsson, D. (2003) Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of Ximelagatran, an Oral Direct Thrombin Inhibitor, in Rats, Dogs, and Humans. *Drug Metabolism and Disposition* **31**, 294-305.
- Ertl, P., Rohde, B., Selzer, P. (2000) Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. *J. Med. Chem.* **43**, 3714-3717.
- Ettmayer, P., Amidon, G.L., Clement, B., Testa, B. (2004) Lessons Learned from Marketed and Investigational Prodrugs. *J. Med. Chem.* **47**, 2393-2404.
- Ewing, W.R., Pauls, H.W., Spada, A.P. (1999) Progress in the design of inhibitors of coagulation factor Xa. *Drugs of the Future* **24**, 771-787.
- Fiessinger, J.N., Huisman, M.V., Davidson, B.L., Bounameaux, H., Francis, C.W., Eriksson, H., Lundstrom, T., Berkowitz, S.D., Nystrom, P., Thorsen, M., Ginsberg, J.S. (2005) Ximelagatran vs low-molecular-weight heparin and warfarin for the treatment of deep vein thrombosis: a randomized trial. THRIVE Treatment Study Investigators. *JAMA* **293**, 681-689.
- Francis, C.W. (2004) Ximelagatran: a new oral anticoagulant. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* **17**, 139-152.

Frérot, E., Coste, J., Pantaloni, A., Dufour, M.N., Jouin, P. (1991) PyBOP® and PyBroP: Two reagents for the difficult coupling of the α,α -dialkyl amino acid, *Aib. Tetrahedron* **47**, 259-270.

Geiger, J. (1999) Anti-aggregatory drugs: I. Platelet receptor antagonists. *Exp. Opin. Ther. Patents* **9**, 1389-1414.

Gilon, C., Dechantsreiter, M.A., Burkhart, F., Friehtler, A., Kessler, H. (2004) 10.1 Synthesis of N-Alkylated Peptides. In: *Methods of Organic Chemistry (Houben-Weyl), Additional and Supplementary Volumes to the 4th Edition, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*. Workbench Edition **Vol. E 22c**, Goodman, M., Felix, A., Moroder, L, Toniolo, C. (Eds.) *Georg Thieme Verlag Stuttgart New York*, 213-271.

Goodman, M., Felix, A., Moroder, L, Toniolo, C. (Eds.) (2004) Methods of Organic Chemistry (Houben-Weyl), Additional and Supplementary Volumes to the 4th Edition, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics. *Georg Thieme Verlag Stuttgart New York*, Workbench Edition **Vol. E 22a-e**.

Guertin, K.R., Gardner, C.J., Klein, S.I., Zulli, A.L., Czekaj, M., Gong, Y., Spada, A.P., Cheney, D.L., Maignan, S., Guilloteau, J.P., Brown, K.D., Colussi, D.J., Chu, V., Heran, C.L., Morgan, S.R., Bentley, R.G., Dunwiddie, C.T., Leadley, R.J., Pauls, H.W. (2002) Optimization of the β -Aminoester Class of Factor Xa Inhibitors. Part 2: Identification of FXV673 as a Potent and Selective Inhibitor with Excellent In Vivo Anticoagulant Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 1671-1674.

Gustafsson, D., Antonsson, T., Bylund, R., Eriksson, U., Gyzander, E., Nilsson, I., Elg, M., Mattson, C., Deinmum, J., Pehrsson, S., Karlsson, O., Nilsson, A., Sörensen, H. (1998) Effects of melagatran, a new low-molecular-weight thrombin inhibitor, on thrombin and fibrinolytic enzymes. *Thromb. Haemost.* **79**, 110-118.

Gustafsson, D., Nyström, J.E., Carlsson, S., Bredberg, U., Eriksson, U., Gyzander, E., Elg, M., Antonsson, T., Hoffmann, K.J., Ungell, A.L., Sörensen, H., Någård, S., Abrahamsson, A., Bylund, R. (2001) The Direct Thrombin Inhibitor Melagatran and Its Oral Prodrug H 376/95: Intestinal Absorption Properties, Biochemical and Pharmacodynamic Effects. *Thromb. Res.* **101**, 171-181.

Gustafsson, D., Bylund, R., Antonsson, T., Nilsson, I., Nyström, J.E., Eriksson, U., Bredberg, U., Teger-Nilsson, A.C. (2004) A new oral anticoagulant: the 50-year challenge. *Nature Reviews Drug Discovery* **3**, 649-659.

Haginoya, N., Kobayashi, S., Komoriya, S., Yoshino, T., Suzuki, M., Shimada, T., Watanabe, K., Hirokawa, Y., Furugori, T., Nagahara T. (2004a) Synthesis and Conformational Analysis of a Non-Amidine Factor Xa Inhibitor That Incorporates 5-Methyl-4,5,6,7-tetrahydrothiazolo[5,4-c]pyridine as S4 Binding Element. *J. Med. Chem.* **47**, 5167-5182.

Haginoya, N., Kobayashi, S., Komoriya, S., Yoshino, T., Nagata, T., Hirokawa, Y., Nagahara T. (2004b) Design, synthesis, and biological activity of non-amidine factor Xa inhibitors containing pyridine N-oxide and 2-carbamoylthiazole units. *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 5579-5586.

Halperin, J.L. (2005) Ximelagatran: oral direct thrombin inhibition as anticoagulant therapy in atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **45**, 1-9.

Hara, T., Yokoyama, A., Tanabe, K., Ishihara, H., Iwamoto, M. (1995) DX-9065a, an Orally Active, Specific Inhibitor of Factor Xa, Inhibits Thrombosis without Affecting Bleeding Time in Rats. *Thrombosis Haemostasis* **74**, 635-639.

Harrison, P. (2004) Measuring platelet function? *The Hematology Journal* **5**, S164-S169.

Hauptmann, J., Stürzebecher, J. (1999) Synthetic inhibitors of thrombin and factor Xa: From bench to bedside. *Thromb. Res.* **93**, 203-241.

Hauptmann, J. (2002) Pharmacokinetics of an emerging new class of anticoagulant/antithrombotic drugs. A review of small-molecule thrombin inhibitors. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **57**, 751-758.

Hauptmann, J., Steinmetzer, T., Vieweg, H., Wikström, P., Stürzebecher, J. (2002) Influence of structural variations in peptidomimetic 4-amidinophenylalanine-derived thrombin inhibitors on plasma clearance and biliary excretion in rats. *Pharm. Res.* **19**, 1027-1033.

Herron, D.K., Goodson, T.Jr., Wiley, M.R., Weir, L.C., Kyle, J.A., Yee, Y.K., Tebbe, A.L., Tinsley, J.M., Mendel, D., Masters, J.J., Franciskovich, J.B., Sawyer, J.S., Beight, D.W., Ratz, A.M., Milot, G., Hall, S.E., Klimkowski, V.J., Wikel, J.H., Eastwood, B.J., Towner, R.D., Gifford-Moore, D.S., Craft, T.J., Smith, G.F. (2000) 1,2-Dibenzamidobenzene Inhibitors of Human Factor Xa. *J. Med. Chem.* **43**, 859-872.

Hirayama, F., Koshio, H., Katayama, N., Kurihara, H., Taniuchi, Y., Sato, K., Hisamichi, N., Sakai-Moritani, Y., Kawasaki, T., Matsumoto, Y., Yanagisawa, I. (2002a) The Discovery of YM-60828: A Potent, Selective and Orally-Bioavailable Factor Xa Inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 1509-1523.

Hirayama, F., Koshio, H., Ishihara, T., Watanuki, S., Hachiya, S., Kaizawa, H., Kuramochi, T., Katayama, N., Kurihara, H., Taniuchi, Y., Sato, K., Sakai-Moritani, Y., Kaku, S., Kawasaki, T., Matsumoto, Y., Sakamoto, S., Tsukamoto, S. (2002b) Design, Synthesis and Biological Activity of YM-60828 Derivatives: Potent and Orally-Bioavailable Factor Xa Inhibitors Based on Naphthoanilide and Naphthalensulfonanilide Templates. *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 2597-2610.

Hirayama, F., Koshio, H., Katayama, N., Ishihara, T., Kaizawa, H., Taniuchi, Y., Sato, K., Sakai-Moritani, Y., Kaku, S., Kurihara, H., Kawasaki, T., Matsumoto, Y., Sakamoto, S., Tsukamoto, S. (2003) Design, Synthesis and Biological Activity of YM-60828 Derivatives. Part 2: Potent and Orally-Bioavailable Factor Xa Inhibitors Based on Benzothiadiazine-4-one Templates. *Bioorg. Med. Chem.* **11**, 367-381.

Hirsh, J., Warkentin, T.E., Raschke, R., Granger, C., Ohman, E.M., Dalen, J.E. (1998) Heparin and Low-Molecular-Weight Heparin Mechanisms of Action, Pharmacokinetics, Dosing Considerations, Monitoring, Efficacy, and Safety. *Chest* **114**, (Suppl.) 489S–510S.

Hirsh, J., Dalen, J.E., Anderson, D.R., Poller, L., Bussey, H., Ansell, J., Deykin, D. (2001a) Oral Anticoagulants: Mechanism of Action, Clinical Effectiveness, and Optimal Therapeutic Range. *Chest* **119**, (Suppl.) 8S-21S.

Hirsh, J., Warkentin, T.E., Shaughnessy, S.G., Anand, S.S., Halperin, J.L., Raschke, R., Granger, C., Ohman, E.M., Dalen, J.E. (2001b) Heparin and Low-Molecular-Weight Heparin Mechanisms of Action, Pharmacokinetics, Dosing, Monitoring, Efficacy, and Safety. *Chest* **119**, (Suppl.) 64S-94S.

- Hirsh, J., O'Donnell, M., Weitz, J.I. (2005) New anticoagulants. *Blood* **105**,453-463.
- Hoffmann, M., Monroe, D.M. III (2001) A Cell-based Model of Hemostasis. *Thromb. Haemost.* **85**, 958-965.
- Huang, W., Naughton, M.A., Yang, H., Su, T., Dam, S., Wong, P.W., Arfsten, A.E., Edwards, S.T., Sinha, U., Hollenbach, S.J., Scarborough, R.M., Zhu, B.Y. (2003) Design, Synthesis, and Structure-Activity Relationships of Unsubstituted Piperazinone-Based Transition State Factor Xa Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 723-728.
- Jia, Z.J., Wu, Y., Huang, W., Goldman, E.A., Zhang, P., Woolfrey, J., Wong, P.W., Huang, B., Sinha, U., Park, G., Reed, A., Scarborough, R.M., Zhu, B.Y. (2002) Design, Synthesis, and Biological Activity of Novel Non-Amidine Factor Xa Inhibitors. Part 1: P1 Structure-Activity Relationships of the 1-(2-Naphthyl)-1*H*-pyrazole-5-carboxylamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 1651-1655.
- Jia, Z.J., Wu, Y., Huang, W., Zhang, P., Clizbe, L.A., Goldman, E.A., Sinha, U., Arfsten, A.E., Edwards, S.T., Alphonso, M., Hutchaleelaha, A., Scarborough, R.M., Zhu, B.Y. (2004a) 1-(2-Naphthyl)-1*H*-pyrazole-5-carboxylamides as potent factor Xa inhibitors. Part 2: A survey of P4 motifs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 1221-1227.
- Jia, Z.J., Wu, Y., Huang, W., Zhang, P., Song, Y., Woolfrey, J., Sinha, U., Arfsten, A.E., Edwards, S.T., Hutchaleelaha, A., Hollenbach, S.J., Lambing, J.L., Scarborough, R.M., Zhu, B.Y. (2004b) 1-(2-Naphthyl)-1*H*-pyrazole-5-carboxylamides as potent factor Xa inhibitors. Part 3: Design, synthesis and SAR of orally bioavailable benzamidine-P4 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 1229-1234.
- Johnson, T.B., Hill, A.J. (1914) Researches on pyrimidines. LXVII. The condensation of thiourea with ethyl allylacetate. *J. Am. Chem. Soc.* **36**, 364-372.
- Jones, S.D., Liebeschuetz, J.W., Morgan, P.J., Murray, C.W., Rimmer, A.D., Roscoe, J.M.E., Waszkowycz, B., Welsh, P.M., Wylie, W.A., Young, S.C., Martin, H., Mahler, J., Brady, L., Wilkinson, K. (2001) The Design of Phenylglycine Containing Benzamidine Carboxamides as Potent and Selective Inhibitors of Factor Xa. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 733-736.
- Judkins, B.D., Allen, D.G., Cook, T.A., Evans, B., Sardharwala, T.E. (1996) A versatile synthesis of amidines from nitriles via amidoximes. *Synthetic Comm.* **26**, 4351-4367.

Kaiser, B., Hauptmann, J., Markwardt, F. (1987) Untersuchungen zur Pharmakodynamik synthetischer Thrombininhibitoren vom Typ basisch substituierter N- α -arylsulfonylierter Phenylalaninamide. *Pharmazie* **42**, 119–121.

Kaiser, B. (2002) Factor Xa – a promising target for drug development. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 189-192.

Kamata, K., Kawamoto, H., Honma, T., Iwama T., Kim, S.H. (1998) Structural basis for chemical inhibition of human blood coagulation factor Xa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6630–6635.

Katakura, S., Nagahara, T., Hara, T., Iwamoto, M. (1993) A Novel Factor Xa Inhibitor: Structure-Activity Relationships and Selectivity between Factor Xa and Thrombin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **197**, 965-972.

King, J.F., Lam, J.Y.L., Skonieczny, S. (1992) Mechanisms, of hydrolysis and related nucleophilic displacement reactions of alkanesulfonyl chlorides: pH dependence and the mechanism of hydration of sulfenes. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 1743-1749.

Kochhar, S., Christen, P. (1989) Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide. *Anal. Biochem.* **178**, 17-21.

Kolde, H.J. (2001) Haemostasis. Physiology Pathology Diagnostics. *Pentapharm Ltd. Basel/Switzerland, MB Partner Production GmbH Basel.*

Koshio, H., Hirayama, F., Ishihara, T., Taniuchi, Y., Sato, K., Sakai-Moritani, Y., Kaku, S., Kawasaki, T., Matsumoto, Y., Sakamoto, S., Tsukamoto, S. (2004a) Synthesis and biological activity of novel 1,4-diazepane derivatives as factor Xa inhibitor with potent anticoagulant and antithrombotic activity. *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 2179-2191.

Koshio, H., Hirayama, F., Ishihara, T., Kaizawa, H., Shigenaga, T., Taniuchi, Y., Sato, K., Moritani, Y., Iwatsuki, Y., Uemura, T., Kaku, S., Kawasaki, T., Matsumoto, Y., Sakamoto, S., Tsukamoto, S. (2004b) Orally active factor Xa inhibitor: synthesis and biological activity of masked amidines as prodrugs of novel 1,4-diazepane derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 5415-5426.

Leblond, L., Winocour, P.D. (1999) The Coagulation Pathway and Antithrombotic Strategies. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, **Vol. 132**, Uprichard A.C.G., Gallagher, K.P. (Eds.), *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 1-39.

Liang, A.M., Light, D.R., Kochanny, M., Rumennik, G., Trinh, L., Lentz, D., Post, J., Morser, J., Snider, M., (2003) Discovery and characterization of a potent and selective non-amidine inhibitor of human factor Xa. *Biochem. Pharmacol.* **65**, 1407-1418.

Light, D.R., Guilford, W.J. (2001) Discovery of the Factor Xa Inhibitor, ZK 807834 (CI-1031). *Curr. Topics Med. Chem.* **1**, 121-136.

Lin, Z., Johnson, M.E. (1995) Proposed cation- π mediated binding by factor Xa: a novel enzymatic mechanism for molecular recognition. *FEBS Lett.* **370**, 1-5.

Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J. (1997) Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **23**, 3-25.

Lipinski, C.A. (2000) Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **44**, 235-249.

Lipinski, C.A. (2001) Avoiding investment in doomed drugs. Is poor solubility an industry wide problem? *Current Drug Discovery* 17-19.

López-Tocón, I., Otero, J.C., Soto, J., Becucci, M., Pietraperzia, G., Castellucci, E. (2004) Vibrational predissociation dynamics of the aniline-neon van der Waals complex: an ab initio study. *Chemical Physics* **303** 143–150.

Lu, G., Broze, G.J.Jr., Krishnaswamy, S. (2004) Formation of Factors IXa and Xa by the Extrinsic Pathway. *J.Biol.Chem.* **279**, 17241-17249.

Maignan, S., Mikol, V. (2001) The Use of 3D Structural Data in the Design of Specific Factor Xa Inhibitors. *Curr. Topics Med. Chem.* **1**, 161-174.

Mancuso, A.J., Brownfain, D.S., Swern, D. (1979) Structure of the dimethyl sulfoxide-oxalyl chloride reaction product. Oxidation of heteroaromatic and diverse alcohols to carbonyl compounds. *J. Org. Chem.* **44**, 4148-4150.

Maraganore, J.M., Bourdon, P., Jablonski, J., Ramachandran, K.L., Fenton J.W. II (1990) Design and Characterization of Hirulogs: A Novel Class of Bivalent Peptide Inhibitors of Thrombin. *Biochemistry* **29**, 7095-7101.

Markwardt, F. (1957) Die Isolierung und chemische Charakterisierung des Hirudins. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **308**, 147-156.

Markwardt, F. (1970) Hirudin is an inhibitor of thrombin. *Meth. Enzymol.* **19**, 924-932.

Markwardt, F., Richter, P., Stürzebecher, J., Wagner, G., Walsmann, P. (1974) Synthetic inhibitors of serine proteinases. 6. Inhibition of trypsin, plasmin and thrombin by phenylpyruvic acids with several basic substituents. *Acta Biol. Med. Ger.* **33**, K1-K7.

Maron D., Ames B. (1983) Revised Methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research* **113**, 173-215.

Marquis, R.W., Ward, K.W., Roethke, T., Smith, B.R., Ru, Y., Yamashita, D.S., Tomaszek, T.A., Gorycki, P.D., Cheng, H.Y., James, I.E., Stroup, G.B., Lark, M.W., Gowen, M., Veber, D.F. (2004) An Azepanone-Based Inhibitor of Human Cathepsin K with Improved Oral Bioavailability in the Rat and the Monkey. *Molecular Pharmaceutics* **1**, 97-100.

Masters, J.J., Franciskovich, J.B., Tinsley, J.M., Campbell, C., Campbell, J.B., Craft, T.J., Froelich, L.L., Gifford-Moore, D.S., Hay, L.A., Herron, D.K., Klimkowski, V.J., Kurz, K.D., Metz, J.T., Ratz, A.M., Shuman, R.T., Smith, G.F., Smith, T., Towner, R.D., Wiley, M.R., Wilson, A., Yee, Y.K. (2000) Non-Amidine-Containing 1,2-Dibenzamidobenzene Inhibitors of Human Factor Xa with Potent Anticoagulant and Antithrombotic Activity. *J. Med. Chem.* **43**, 2087-2092.

Mederski, W.W.K.R., Dorsch, D., Anzali, S., Gleitz, J., Cezanne, B., Tsaklakidis, C. (2004a) Halothiophene benzimidazoles as P1 surrogates of inhibitors of blood coagulation factor Xa. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 3763-3769.

Mederski, W.W.K.R., Cezanne, B., van Amsterdam, C., Bühring, K.U., Dorsch, D., Gleitz, J., März, J., Tsaklakidis, C. (2004b) Chlorothiophenecarboxamides as P1 surrogates of inhibitors of blood coagulation factor Xa. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 5817-5822.

- Mignatti, P., Rifkin, D.B. (1993) Biology and Biochemistry of Proteinases in Tumor Invasion. *Physiol. Rev.* **73**, 161–195.
- Moll, S., Roberts, H.R. (2002) Overview of Anticoagulant Drugs for the Future. *Semin. Hematol.* **39**, 145-157.
- Moroder, L., Hallett, A., Wunsch, E., Lekker, O., Wersin, G. (1976) Di-tert.-Butyldicarbonat - ein vorteilhaftes Reagenz zur Einführung der tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe. *Hoppe-Seyley's Z. Physiol. Chem.* **357**, 1651-1653.
- Müller, M.M.(2003) Rationales Wirkstoffdesign und Synthese niedermolekularer Inhibitoren der Serinproteasen Faktor Xa und Urokinase-Plasminogen Aktivator. Neuartige Wirkstoffe zur anti-metastatischen bzw. antithrombotischen Therapie. *Dissertation* TU München.
- Mutschler, E., Geisslinge, G., Kroemer, H.K., Schäfer-Korting, M. (2001) Mutschler Arzneimittelwirkungen. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart* **8. Auflage**.
- Nar, H., Bauer, M., Schmid, A., Stassen, J.M., Wienen, W., Pripke, H.W.M., Kauffmann, I.K., Ries, U.J., Huel, N.H. (2001) Structural Basis for Inhibition Promiscuity of Dual Specific Thrombin and Factor Xa Blood Coagulation Inhibitors. (2001) *Structure* **9**, 29-37.
- Nesheim, M. (2003) Thrombin and Fibrinolysis. *Chest* **124**, (Suppl.) 33S–39S.
- Okamoto, S., Hijikata, A., Kikumoto, R., Tonomura, S., Hara, H., Ninomiya, K., Maruyama, A., Sugano, M., Tamao, Y. (1981) Potent inhibition of thrombin by the newly synthesized arginine derivative No. 805: the importance of the stereostructure of ist hydrophobic carboxamide portion. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **101**, 440-446.
- Otto, C. (2003) Untersuchungen zur antithrombotischen Wirkung neuer Hemmstoffe des Faktor Xa. *Dissertation* FSU Jena.
- Padmanabhan, K., Padmanabhan, K.P., Tulinsky, A., Park, C.H., Bode, W., Huber, R., Blankenship, D.T., Cardin, A.D., Kisiel, W. (1993) Structure of human des(1-45) factor Xa at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **232**, 947-966.
- Pallottini, V., Marino, M., Ascenzi, P. (2002) Clonidine displacement from type 1 imidazoline receptor by p-aminobenzamidine, the prototype of trypsin-like serine protease inhibitors. *IUBMB Life* **54**, 301–304.

Palm, K., Stenberg, P., Luthman, K., Artursson, P. (1997) Polar molecular surface properties predict the intestinal absorption of drugs in humans. *Pharm. Res.* **14**, 568-571.

Palm, K., Luthman, K., Ungell, A.L., Strandlund, G., Beigi, F., Lundahl, P., Artursson, P. (1998) Evaluation of dynamic polar molecular surface area as predictor of drug absorption: comparison with other computational and experimental predictors. *J. Med. Chem.* **41**, 5382-5392.

Parlow, J.J., Case, B.L., Dice, T.A., Fenton, R.L., Hayes, M.J., Jones, D.E., Neumann, W.L., Wood, R.S., Lachance, R.M., Girard, T.J., Nicholson, N.S., Clare, M., Stegeman, R.A., Stevens, A.M., Stallings, W.C., Kurumbail, R.G., South, M.S. (2003a) Design, Parallel Synthesis, and Crystal Structures of Pyrazinone Antithrombotics as Selective Inhibitors of the Tissue Factor VIIa Complex. *J. Med. Chem.* **46**, 4050-4062.

Parlow, J.J., Stevens, A.M., Stegeman, R.A., Stallings, W.C., Kurumbail, R.G., South, M.S. (2003b) Synthesis and Crystal Structures of Substituted Benzenes and Benzoquinones as Tissue Factor VIIa Inhibitors. *J. Med. Chem.* **46**, 4297-4312.

Parlow, J.J., Kurumbail, R.G., Stegeman, R.A., Stevens, A.M., Stallings, W.C., South, M.S. (2003c) Design, Synthesis, and Crystal Structure of Selective 2-Pyridone Tissue Factor VIIa Inhibitors. *J. Med. Chem.* **46**, 4696-4701.

Parry, M.A., Fernandez-Catalan, C., Bergner, A., Huber, R., Hopfner, K.P., Schlott, B., Guhrs, K.H., Bode, W. (1998) The ternary microplasmin-staphylokinase-microplasmin complex is a proteinase-cofactor-substrate complex in action. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 917-23.

Patai, S., Rappoport, Z. (Eds.) (1991) The chemistry of amidines and imidates. *John Wiley & Sons, Chichester New York Brisbane Toronto Singapore* **Volume 2**.

Patrono, C., Collier, B., Dalen, J.E., FitzGerald, G.A., Fuster, V., Gent, M., Hirsh, J., Roth, G. (2001) Platelet-Active Drugs The Relationships Among Dose, Effectiveness, and Side Effects. *Chest* **119**, (Suppl.) 39S-63S.

Pelzer, H., Schwarz, A., Stüber, W. (1991) Determination of human prothrombin activation fragment 1 + 2 in plasma with an antibody against a synthetic peptide. *Thromb. Haemost.* **65**, 153-159.

Perzborn E, Strassburger J, Wilmen A, Pohlmann J, Roehrig S, Schlemmer K-H, Straub A. (2005) In vitro and in vivo studies of the novel antithrombotic agent BAY 59-7939 - an oral, direct Factor Xa inhibitor. *J. Thromb. Haemost.* **3**, 514-21.

Pinto, D.J.P., Orwat, M.J., Wang, S., Fevig, J.M., Quan, M.L., Amparo, E., Cacciola, J., Rossi, K.A., Alexander, R.S., Smallwood, A., Luetzgen, J.M., Liang, L., Aungst, B.J., Wright, M.R., Knabb, R.M., Wong, P.C., Wexler, R.R., Lam, P.Y.S. (2001) Discovery of 1-[3-(Aminomethyl)phenyl]-N-[3-fluoro-2'-(methylsulfonyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl]-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-5-carboxamide (DPC423), a Highly Potent, Selective, and Orally Bioavailable Inhibitor of Blood Coagulation Factor Xa. *J. Med. Chem.* **44**, 566-579.

Pruitt, J.R., Pinto, D.J.P., Galembo, R.A.Jr., Alexander, R.S., Rossi, K.A., Wells, B.L., Drummond, S., Bostrom, L.L., Burdick, D., Bruckner, R., Chen, H., Smallwood, A., Wong, P.C., Wright, M.R., Bai, S., Luetzgen, J.M., Knabb, R.M., Lam, P.Y.S., Wexler, R.R. (2003) Discovery of 1-(2-Aminomethylphenyl)-3-trifluoromethyl-N-[3-fluoro-2'-(aminosulfonyl)[1,1'-biphenyl]-4-yl]-1H-pyrazole-5-carboxamide (DPC602), a Potent, Selective, and Orally Bioavailable Factor Xa Inhibitor. *J. Med. Chem.* **46**, 5298-5315.

Quan, M.L., Wexler, R.R. (2001) The Design and Synthesis of Noncovalent Factor Xa Inhibitors. *Curr. Topics Med. Chem.* **1**, 137-149.

Quan, M.L., Ellis, C.D., He, M.Y., Liauw, A.Y., Woerner, F.J., Alexander, R.S., Knabb, R.M., Lam, P.Y.S., Luetzgen, J.M., Wong, P.C., Wright, M.R., Wexler, R.R. (2003) Nonbenzimidine Tetrazole Derivatives as Factor Xa Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 369-373.

Quan, M.L., Smallheer, J.M. (2004) The race to an orally active Factor Xa inhibitor: Recent advances. *Curr. Opin. Drug Discovery & Development* **7**, 460-469.

Quan, M.L., Lam, P.Y.S., Han, Q., Pinto, D.J.P., He, M.Y., Li, R., Ellis, C.D., Clark, C.G., Teleha, C.A., Sun, J.H., Alexander, R.S., Bai, S., Luetzgen, J.M., Knabb, R.M., Wong, P.C., Wexler, R.R. (2005) Discovery of 1-(3'-Aminobenzisoxazol-5'-yl)-3-trifluoromethyl-N-[2-fluoro-4-[(2'-dimethylaminomethyl)imidazol-1-yl]phenyl]-1H-pyrazole-5-carboxamide Hydrochloride (Razaxaban), a Highly Potent, Selective, and Orally Bioavailable Factor Xa Inhibitor. *J. Med. Chem.* **48**, 1729-1744.

Quiao, J.X., Cheng, X., Modi, D.P., Rossi, K.A., Luetgen, J.M., Knabb, R.M., Jadhav, P.K., Wexler, R.R. (2005) 5-Amidinobenzo[*b*]thiophenes as dual inhibitors of factors IXa and Xa. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 29-35.

Ratcliffe, S.J., Young, G.T., Stein, R.L. (1985) Amino acids and peptides. Part 49. 2-Amino-4-(3-pyridyl)butyric acid and related peptides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* 1767-1771.

Renatus, M., Bode, W., Stürzebecher, J., Stubbs, M.T. (1998) Structural and Functional Analyses of Benzamidine-Based Inhibitors in Complex with Trypsin: Implications for the Inhibition of Factor Xa, tPA, and Urokinase. *J. Med. Chem.* **41**, 5445-5456.

Rester, U., Bode, W., Moser, M., Parry, M.A., Huber, R., Auerswald, E. (1999) Structure of the complex of the antistasin-type inhibitor bdellastasin with trypsin and modelling of the bdellastasin-microplasmin system. *J. Mol. Biol.* **293**, 93-106.

Robinson, L.A., Saiah, E.M.K. (2002) Chapter 9. Anticoagulants: Inhibitors of the Factor VIIa/Tissue Factor Pathway. In: *Ann. Rep. Med. Chem.* **37**, 85-94.

Salyers, A.K., Szalony, J.A., Suleymanov, O.D., Parlow, J.J., Wood R.S., South, M.S., Nicholson, N.S. (2004) Assessment of Bleeding Propensity in Non-Human Primates by Combination of Selective Tissue Factor/VIIa Inhibition and Aspirin Compared to Warfarin and Aspirin Treatment. *Pharmacology* **40**, 100-106.

Schärer, K., Morgenthaler, M., Paulini, R., Obst-Sander, U., Banner, D.W., Schlatter, D., Benz, J., Stihle, M., Diederich, F. (2005) Quantifizierung von Kation- π -Wechselwirkungen in Protein-Ligand-Komplexen: Kristallstrukturanalyse eines Komplexes von Faktor Xa und einem quartären Ammonium-Ion-Liganden. *Angew. Chem.* **117**, 4474-4479.

Schechter L., Berger A., (1967) On size of active site in proteases. 1. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **27**, 157-162.

Schwarz, G., Alberts., H., Kricheldorf, H.R. (1981) Syntheses and Reactions of (Trimethylsilyloxy)benzoyl Chlorides. *Liebigs Ann. Chem.* **1981**, 1257-1270.

Schweinitz, A., Steinmetzer, T., Banke, I.J., Arlt, M.J.E., Stürzebecher, A., Schuster, O., Geissler, A., Giersiefen, H., Zeslawska, E., Jacob, U., Krüger, A., Stürzebecher, J. (2004) Design of Novel and Selective Inhibitors of Urokinase-type Plasminogen Activator with Improved Pharmacokinetic Properties for Use as Antimetastatic Agents. *J. Biol. Chem.* **279**, 33613–33622.

Shaw, K.J., Guilford, W.J., Dallas, J.L., Koovakkaat, S.K., McCarrick, M.A., Liang, A., Light, D.R., Morrissey, M.M. (1998) (Z,Z)-2,7-Bis(4-amidinobenzylidene)cycloheptan-1-one: Identification of a highly active inhibitor of blood coagulation factor Xa. *J. Med. Chem.* **41**, 3551-3556.

Sheehan, S.M., Masters, J.J., Wiley, M.R., Young, S.C., Liebeschuetz, J.W., Jones, S.D., Murray, C.W., Franciskovich, J.B., Engel, D.B., Weber, W.W., Marimuthu, J., Kyle, J.A., Smallwood, J.K., Farnen, M.W., Smith, G.F. (2003) A Four Component Coupling Strategy for the Synthesis of D-Phenylglycinamide-derived Non-Covalent Factor Xa Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 2255-2259.

Sixma, J.J., de Groot, P.G. (1992) The ideal anti-thrombotic drug. *Thromb. Res.* **68**, 507-512.

Smallheer, J.M., Alexander, R.S., Wang, J., Wang, S., Nakajima, S., Rossi, K.A., Smallwood, A., Barbera, F., Burdick, D., Luettgen, J.M., Knabb, R.M., Wexler, R.R., Jadhav, P.K. (2004) SAR and factor IXa crystal structure of a dual inhibitor of factors IXa and Xa. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 5263-5267.

Song, Y., Clizbe, L., Bhakta, C., Teng, W., Li, W., Wu, Y., Jia, Z.J., Zhang, P., Wang, L., Doughan, B., Su, T., Kanter, J., Woolfrey, J., Wong, P., Huang, B., Tran, K., Sinha, U., Park, G., Reed, A., Malinowski, J., Hollenbach, S., Scarborough, R.M., Zhu, B.Y. (2002a) Design, Synthesis, and SAR of Substituted Acrylamides as Factor Xa Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 1511-1515.

Song, Y., Clizbe, L., Bhakta, C., Teng, W., Li, W., Wong, P., Huang, B., Sinha, U., Park, G., Reed, A., Scarborough, R.M., Zhu, B.Y. (2002b) Substituted Acrylamides as Factor Xa Inhibitors: Improving Bioavailability by P1 Modification. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 2043-2046.

Song, Y., Clizbe, L., Bhakta, C., Teng, W., Wong, P., Huang, B., Tran, K., Sinha, U., Park, G., Reed, A., Scarborough, R.M., Zhu, B.Y. (2003) Design and Synthesis of Factor Xa Inhibitors and Their Prodrugs *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 297-300.

Steinmetzer, T., Hauptmann, J., Stürzebecher, J. (2001) Advances in the development of thrombin inhibitors. *Exp. Opin. Invest. Drugs* **10**, 845-864.

Steinmetzer, T. (2003) Beiträge zur Entwicklung synthetischer Thrombinhemmstoffe als potentielle Antikoagulanzen. *Habilitationsschrift* FSU Jena.

Steinmetzer, T., Stürzebecher, J. (2004) Progress in the development of synthetic thrombin inhibitors as new orally active anticoagulants. *Curr. Med. Chem.* **11**, 2297-2321.

Stubbs M.T., Bode, W. (1993) A player of many parts: the spotlight falls on thrombin's structure. *Thromb. Res.* **69**, 1-58.

Stüber, W., Koschinsky, R., Reers, M., Hoffmann, D., Czech, J., Dickneite, G. (1995) Preparation and Evaluation of PEG-Bound Thrombin Inhibitors Based on 4-Amidinophenylalanine. *Peptide Res.* **8**, 78-85.

Stürzebecher, J., Markwardt, F., Voigt, B., Wagner, G., Wagner, G., Walsmann, P. (1983) Cyclic amides of N^α-arylsulfonylaminoacylated 4-amidinophenylalanine - tight binding inhibitors of thrombin. *Thromb. Res.* **29**, 267-278.

Stürzebecher, J., Stürzebecher, U., Vieweg, H., Wagner, G., Hauptmann, J., Markwardt, F. (1989) Synthetic inhibitors of bovine factor Xa and thrombin comparison of their anticoagulant efficiency. *Thromb. Res.* **54**, 245-252.

Stürzebecher, J., Prasa, D., Bretschneider, E., Bode, W., Bauer, M., Brandstetter, H., Wikström, P., Vieweg, H. (1993) New developments in the field of benzamidine-derived thrombin inhibitors. In: *DIC: Pathogenesis, Diagnosis and Therapy of Disseminated Intravascular Fibrin Formation*, Müller-Berghaus, G., Madlener, G., Blombäck, M., ten Cate, J.W. (Eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, London, New York, Tokyo, 183-190.

Stürzebecher, J., Prasa, D., Hauptmann, J., Vieweg, H., Wikström, P. (1997) Synthesis and structure-activity relationships of potent thrombin inhibitors: piperazides of 3-amidinophenylalanine. *J. Med. Chem.* **40**, 3091-99.

Stürzebecher, J., Steinmetzer, T., Künzel, S., Schweinitz, A. (2001) Hemmstoffe für den Gerinnungsfaktor Xa. **WO 01/96366**.

Stürzebecher, J., Steinmetzer, T., Schweinitz, A., Stürzebecher, A. (2005) Basisch-substituierte Benzylaminanaloge als Inhibitoren des Gerinnungsfaktors Xa, ihre Herstellung und Verwendung. **WO 2005/026198**.

Su, T., Yang, H., Volkots, D., Woolfrey, J., Dam, S., Wong, P., Sinha, U., Scarborough, R.M., Zhu, B.Y. (2003) Design, synthesis, and Structure-Activity Relationships of Substituted Piperazinone-Based Transition State Factor Xa Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 729-732.

Suleymanov, O.D., Szalony, J.A., Salyers, A.K., LaChance, R.M., Parlow, J.J., South, M.S., Wood R.S., Nicholson, N.S. (2003) Pharmacological Interruption of Acute Thrombus Formation with Minimal Hemorrhagic Complications by a Small Molecule Tissue Factor/Factor VIIa Inhibitor: Comparison to Factor Xa and Thrombin Inhibition in a Nonhuman Primate Thrombosis Model. *J. Pharm. Exp. Ther.* **306**, 1115-1121.

Szalony, J.A., Suleymanov, O.D., Salyers, A.K., Panzer-Knodle, S.G., Blom, J.D., LaChance, R.M., Case, B.L., Parlow, J.J., South, M.S., Wood R.S., Nicholson, N.S. (2003) Administration of a small molecule tissue factor/Factor VIIa inhibitor in a non-human primate thrombosis model of venous thrombosis: effects on thrombus formation and bleeding time. *Thrombosis Research* **112**, 167-174.

Thamm, P., Kolbeck, W., Musiol, H.J., Moroder, L. (2004) 2.6. Other Side-Chain Protections, 2.6.1. Guanidino Group. In: *Methods of Organic Chemistry (Houben-Weyl), Additional and Supplementary Volumes to the 4th Edition, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*. Workbench Edition **Vol. E 22a**, Goodman, M., Felix, A., Moroder, L, Toniolo, C. (Eds.) *Georg Thieme Verlag Stuttgart New York*, 315-333.

Tardy-Poncet, B., Tardy, B., Reynaud, J., Mahul, P., Mismetti, P., Mazet, E., Guyotat, D. (1999) Efficacy and Safety of Danaparoid Sodium (ORG 10172) in Critically Ill Patients With Heparin-Associated Thrombocytopenia. *Chest* **115**, 1616-1620.

Thomas, D.P. (1996) Venous thrombosis and the "Wessler test". *Thromb Haemost.* **76**, 1-4.

Triplett, D.A. (2000) Coagulation and Bleeding Disorders: Review and Update. *Clinical Chemistry* **46**:8(B), 1260-1269.

Tucker, T.J., Lumma, W.C., Mulichak, A.M., Chen, Z., Naylor-Olsen, A.M., Lewis, S.D., Lucas, R., Freidinger, R.M., Kuo, L.C. (1997) Design of Highly Potent Noncovalent Thrombin Inhibitors That Utilize a Novel Lipophilic Binding Pocket in the Thrombin Active Site. *J. Med. Chem.* **40**, 830-832.

Vieth, M., Siegel, M.G., Higgs, R.E., Watson, I.A., Robertson, D.H., Savin, K.A., Durst, G.L., Hipskind, P.A. (2004) Characteristic Physical Properties and Structural Fragments of Marketed Oral Drugs. *J. Med. Chem.* **47**, 224-232.

Voet, D., Voet, J.G. (1994) Biochemie. *VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim New York Basel Cambridge Tokyo* 1. korrigierter Nachdruck der **1. Auflage** von 1992.

von Depka-Prondzinski, M. (2002) Blutgerinnung. Aktuelle Aspekte der Physiologie, Pathophysiologie, Klinik, Diagnostik, Prophylaxe und Therapie. *UNI-Med Verlag AG Bremen* **1. Auflage**.

Walsmann, P., Markwardt, F. (1981) Biochemische und pharmakologische Aspekte des Thrombininhibitors Hirudin. *Pharmazie* **36**, 653-660.

Warkentin, T.E., Aird, W.C., Rand, J.H. (2003) Platelet-Endothelial Interactions: Sepsis, HIT, and Antiphospholipid Syndrome. *Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program)*, 497-519.

Weitz, J.I., Hirsh, J. (2001) New Anticoagulant Drugs. *Chest* **119**, (Suppl.) 95S-107S.

Wessler, S. Reiner, L., Freiman, D.G., Reimer, S.M., Lertzman, M. (1959) Serum-induced thrombosis - studies of its induction and evolution under controlled conditions in vivo. *Circulation* **20**, 864-874.

Willardsen, J.A., Dudley, D.A., Cody, W.L., Chi, L., McClanahan, T.B., Mertz, T.E., Potoczak, R.E., Narasimhan, L.S., Holland, D.R., Rapundalo, S.T., Edmunds, J.J. (2004) Design, Synthesis, and Biological Activity of Potent and Selective Inhibitors of Blood Coagulation Factor Xa. *J. Med. Chem.* **47**, 4089-4099.

Young, M.B., Barrow, J.C., Glass, K.L., Lundell, G.F., Newton, C.L., Pellicore, J.M., Rittle, K.E., Selnick, H.G., Stauffer, K.J., Vacca, J.P., Williams, P.D., Bohn, D., Clayton, F.C., Cook, J.J., Krueger, J.A., Kuo, L.C., Lewis, S.D., Lucas, B.J., McMasters, D.R., Miller-Stein, C., Pietrak, B.L., Wallace, A.A., White, R.B., Wong, B., Yan, Y., Nantermet, P.G. (2004) Discovery and Evaluation of Potent P1 Aryl Heterocycle-Based Thrombin Inhibitors. *J. Med. Chem.* **47**, 2995-3008.

Zhang, P., Bao, L., Zuckett, J.F., Goldman, E.A., Jia, Z.J., Arfsten, A., Edwards, S., Sinha, U., Hutchaleelaha, A., Park, G., Lambing, J.L., Hollenbach, S.J., Scarborough R.M., Zhu B.Y. (2004a) Design, synthesis, and SAR of anthranilamide-based factor Xa inhibitors incorporating substituted biphenyl P4 motifs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 983-987.

Zhang, P., Bao, L., Zuckett, J.F., Jia, Z.J., Woolfrey, J., Arfsten, A., Edwards, S., Sinha, U., Hutchaleelaha, A., Lambing, J.L., Hollenbach, S.J., Scarborough R.M., Zhu B.Y. (2004b) Design, synthesis, and SAR of anthranilamide-based factor Xa inhibitors with improved functional activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 989-993.

Zhu, B.Y., Scarborough, R.M. (1999) Recent advances in inhibitors of factor Xa in the prothrombinase complex. *Curr. Opin. Cardiovasc. Pulmon. & Renal Invest. Drugs* **1**, 63-88.

Zhu, B.Y., Huang, W., Su, T., Marlowe, C., Sinha, U., Hollenbach, S., Scarborough, R.M. (2001) Discovery of Transition State Factor Xa Inhibitors as Potential Anticoagulant Agents. *Curr. Topics Med. Chem.* **1**, 101-119.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen für Aminosäuren und deren Derivate entsprechen den Empfehlungen des *Nomenclature Committee of IUB* (NC-IUB) und der *IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature* (JCBN) [(1984) *Eur. J. Biochem.*, **138**, 9-37]. Aminosäuren und Aminosäurederivate besitzen, wenn nicht anders gekennzeichnet, L-Konfiguration.

Abkürzungen für chemische Verbindungen und Gruppen sind an den einschlägigen chemischen Nachschlagewerken orientiert [Goodman *et al.*, 2004. *Methods of Organic Chemistry* (Houben-Weyl)].

Weitere verwendete Abkürzungen:

Å	Angström (1 Å = 10 ⁻¹⁰ m)
AcOH	Acetat
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
ADP	Adenosindiphosphat
APPA	4-Amidinophenylbrenztraubensäure
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
ASS	Acetylsalicylsäure
BABCH	2,7-Bis-(4-Amidinobenzyliden) Cycloheptan-1-on
ber.	berechnet
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
Bz	Benzoyl
Bzl	Benzyl
Bzls-Cl	Benzylsulfonylchlorid / Phenylmethansulfonylchlorid
Cbz	Benzyloxycarbonyl
COX-1	Cyclooxygenase-1
Da	Dalton
DAB	Deutsches Arzneibuch
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DiBoc	di- <i>tert.</i> -butyl-Pyrocarbonat
DIEA	Diisopropylethylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

ED ₅₀	Effektive Dosis, die einen halbmaximalen (50 %) Effekt bewirkt
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI	Elektrospray Ionisation
Et	Ethyl
FDA	<i>Federal Drug Administration</i> (Arzneimittelkommission der USA)
FV	Faktor V (inaktiv)
FVa	Faktor Va (aktiv)
FVII	Faktor VII (inaktiv)
FVIIa	Faktor VIIa (aktiv)
FIX	Faktor IX (inaktiv)
FIXa	Faktor IXa (aktiv)
FX	Faktor X (inaktiv)
FXa	Faktor Xa (aktiv)
FXI	Faktor XI (inaktiv)
FXIa	Faktor XIa (aktiv)
FXII	Faktor XII (inaktiv)
FXIIa	Faktor XIIa (aktiv)
gef.	gefunden
Gla	γ -Carboxyglutaminsäure
GP	Glycoprotein
h	Stunde(n)
HCII	Heparin Kofaktor II
HIT	Heparin-induzierte Thrombozytopenie
HIT II	Heparin-induzierte Thrombozytopenie Typ II
HMWK	hochmolekulares Kininogen
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSA	humanes Serumalbumin
IC ₅₀	Konzentration zur halbmaximalen (50%) Hemmung des Enzyms
IC ₂₀₀	Konzentration zur Verdopplung (200%) der Gerinnungszeit
<i>in situ</i>	an Ort und Stelle, in der natürlichen Lage (lat.)
<i>in vitro</i>	unter künstlichen Bedingungen (lat.)
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus (lat.)
I.E.	Internationale Einheiten
<i>i.p.</i>	intraperitoneal

Anhang

<i>i.v.</i>	intravenös
K _i	Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes
LMWH	niedermolekulares Heparin
<i>m</i> -CPBA	<i>meta</i> -Chlorperoxybenzoesäure
Me	Methyl
MeO	Methoxy
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
NAPAP	N ^α -[2-Naphthylsulfonyl]-glycyl- 4-amidinophenylalanin-piperidid
NO	N-Oxid
OBzl	Benzyloxy
OEt	Ethoxy
OMe	Methoxy
OtBu	<i>tert.</i> -Butyloxy
<i>p.a.</i>	<i>pro analysii</i> (für die Analyse, lat.)
PAI-1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor Type 1</i>
PAR	Protease-aktivierbarer Rezeptor
PCa	Protein Ca (aktiv)
Ph	Phenyl
PhEt	Phenylethyl
PhPr	Phenylpropyl
PK	Plasmakallikrein
Prä-PK	Plasmaprækallikrein
PL	Phospholipid
pNA	4-Nitroanilin
ppm	<i>parts per million</i>
Pr	Propyl
PSA	<i>Polar Surface Area</i> (polare Oberfläche)
PT	Prothrombinzeit
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-N-oxy-tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphat
Pyr	Pyridyl
R _f	Retentionszeit (DC)
RP	<i>reversed phase</i>

RP-HPLC	<i>reversed phase High Performance Liquid Chromatography</i>
RT	Raumtemperatur
<i>s.c.</i>	subkutan
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
tBu	<i>tert.</i> -Butyl
TAFI	<i>Thrombin Activated Fibrinolysis Inhibitor</i>
TAP	Tick Anticoagulant Protein
r-TAP	rekombinantes Tick Anticoagulant Protein
TEA	Triethylamin
TF	<i>Tissue Factor</i> (Faktor III)
TFA	Trifluoressigsäure
TFPI	<i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i>
TF/VIIa	<i>Tissue Factor</i> /Faktor VIIa-Komplex
tPA	<i>Tissue-type</i> Plasminogenaktivator
Triflat	Trifluormethansulfonat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TT	Thrombinzeit
UFH	unfraktioniertes Heparin
uPA	<i>Urokinase-type</i> Plasminogenaktivator
scu-PA	einkettige Pro-Urokinase
tcu-PA	zweikettige Urokinase
UV/Vis	Ultraviolett/ <i>visible</i> (sichtbarer Wellenlängenbereich des Lichts)

unnatürliche Aminosäuren:

3-Adf	3-Amidinophenylalanin
Ala(PhEt)	Phenylethylalanin = Phenylpropylglycin
Ala(3-Pyr)	3-Pyridylalanin (2-Amino-3-pyridin-3-yl-Propionsäure)
hAla(2-Pyr)	2-Homopyridylalanin (2-Amino-4-pyridin-2-yl-Buttersäure)
hAla(3-Pyr)	3-Homopyridylalanin (2-Amino-4-pyridin-3-yl- Buttersäure)
hAla(4-Pyr)	4-Homopyridylalanin (2-Amino-4-pyridin-4-yl- Buttersäure)
hPhe	Homophenylalanin (2-Amino-4-phenyl- Buttersäure)
hTyr	Homotyrosin (2-Amino-4-(4-hydroxyphenyl)- Buttersäure)

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Publikationen:

Schweinitz, A., Steinmetzer, T., Banke, I.J., Arlt, M.J.E., Stürzebecher, A., Schuster, O., Geissler, A., Giersiefen, H., Zeslawska, E., Jacob, U., Krüger, A., Stürzebecher, J. (2004) Design of Novel and Selective Inhibitors of Urokinase-type Plasminogen Activator with Improved Pharmacokinetic Properties for Use as Antimetastatic Agents. *J. Biol. Chem.* **279**, 33613–33622.

Stürzebecher, J., Steinmetzer, T., Schweinitz, A., Stürzebecher, A. (2005) Basisch-substituierte Benzylaminanaloga als Inhibitoren des Gerinnungsfaktors Xa, ihre Herstellung und Verwendung. **WO 2005/026198**.

Aus patentrechtlichen Gründen wurden bislang keine Daten zu den in dieser Arbeit zusammengefassten FXa-Hemmstoffen veröffentlicht. Momentan befinden sich jedoch zwei Publikationen in Arbeit:

Schweinitz, A., Stürzebecher, A., Stürzebecher, U., Schuster, O., Stürzebecher, J., Steinmetzer, T. (eingereicht) New substrate analogue inhibitors of factor Xa containing 4-amidinobenzylamide as P1 residue: Part 1. *Medicinal Chemistry*.

Stürzebecher, A., Dönnecke, D., Schweinitz, A., Stürzebecher, U., Schuster, O., Stürzebecher, J., Steinmetzer, T. (in Arbeit) New substrate analogue inhibitors of factor Xa containing 4-amidinobenzylamide as P1 residue: Part 2.

Tagungsbeiträge:

Stürzebecher, A., Steinmetzer, T., Schweinitz, A., Stürzebecher, J. (2004) Highly potent inhibitors of coagulation factor Xa with improved pharmacokinetics. *21st Winter School on Proteinases and Their Inhibitors, Tiers, Italien*.

Stürzebecher, A., Steinmetzer, T., Schweinitz, A., Stürzebecher, U., Dönnecke, D., Stürzebecher, J. (2005) Development of new highly potent and selective inhibitors of factor Xa containing homophenylalanine-derived amino acids at P3-position. *22nd Winter School on Proteinases and Their Inhibitors, Tiers, Italien*.

Danksagung

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Synthesen und Untersuchungen wurden in der Zeit von Januar 2003 bis Juli 2005 bei der Firma Curacyte Chemistry GmbH in Jena unter Betreuung von Herrn Dr. habil. Torsten Steinmetzer in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Marburg unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe durchgeführt.

Mein spezieller Dank gilt Herrn Dr. habil. Torsten Steinmetzer für seine Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen und die praktische Unterstützung bei synthetischen und wissenschaftlichen Problemen, sowie natürlich für seine Geduld und Hilfe bei der Erstellung und Durchsicht meines Manuskriptes.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe, der es mir ermöglicht hat, trotz der Entfernung zu Marburg meine Dissertation in Jena anzufertigen und mich auch bei der Korrektur meiner Arbeit sehr unterstützt hat.

Weiterhin möchte ich den Herren Dr. Helmut Giersiefen und Dr. Andreas Zaby für die Möglichkeit danken, die praktischen Arbeiten im Rahmen meiner Dissertation bei der Firma Curacyte Chemistry GmbH durchzuführen.

Ich danke meinen Kollegen, insbesondere Dr. Daniel Dönnecke, Martin Korsonewski und Cathleen Naumann, für die Hilfe bei den Synthesen und die für diese Arbeit zur Verfügung gestellten Substanzen, sowie Dr. Oliver Schuster für die Anfertigung der Struktur-*Models* verschiedener Inhibitoren und die Beantwortung Struktur-relevanter Fragen.

Des weiteren möchte ich mich bei meinem Vater Prof. Dr. Jörg Stürzebecher und seiner Arbeitsgruppe im Institut für vaskuläre Medizin der FSU Jena für die bereitgestellten Daten aus den Untersuchungen zur Enzymkinetik, Pharmakokinetik und gerinnungshemmenden Aktivität der Inhibitoren bedanken. Ganz besonders dankbar bin ich ihm für die wissenschaftliche Unterstützung und die steten Antworten auf meine vielen Fragen, aber auch seinen Rat bei nicht-dienstlichen Problemen.

Ebenso herzlich danke ich meiner Familie, meiner Mutter Uta und meinen Geschwistern Maria und Lorenz für ihre Geduld und Verständnis, sowie meinem Freund Sebastian, der immer für mich da war.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**Optimierung synthetischer Inhibitoren des Gerinnungsfaktors Xa vom
4-Amidinobenzylamid-Typ**

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 11. August 2005

.....
(Anne Stürzebecher)