

– Biomimetika –

Ihre Synthese durch Übergangsmetall-katalysierte
Schlüsselreaktionen und ihre Anwendung

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
angenommene

Habilitationsschrift von

Dr. rer. nat. Boris Schmidt

Hannover, Dezember 1998

Referenten:

Prof. Oliver Reiser

Prof. Herbert Waldmann

Habilitationsvortrag:

2.12.1998

Anmerkungen: Diese schriftliche Arbeit wurde unter Berücksichtigung der neuen Rechtschreibregeln (Duden 1996) angefertigt. Stichtag für die Einführung der neuen Rechtschreibregeln ist der 1.8.1998. Das neue Regelwerk sieht für einen Übergangszeitraum 2 oder mehr richtige Schreibweisen oder Interpunktionsregeln vor. Die Umsetzung der neuen Regeln ist ungewohnt und in vielen Fällen der Entscheidung des Schreibenden überlassen, deshalb finden sich in dieser Arbeit zahlreiche Ausnahmen. Trotz entsprechender DIN-Vorschriften werden Temperaturen als °C angegeben um eine Verwechslung mit Winkeln zu vermeiden.

Diese Arbeit wurde überwiegend am Institut für Organische Chemie der Universität Hannover durchgeführt. Weitere Arbeiten fanden statt am *Institutet för farmaceutisk organisk kemi, Universitet Uppsala*, Schweden.

Für die großzügige finanzielle Unterstützung dieser Arbeit danke ich:

Professor H. M. R. Hoffmann, PhD, DSc,
dem Institut für Organische Chemie der Universität Hannover,
Professor Anders Hallberg,
dem Deutschen Akademischen Austauschdienst und dem Svenska Institutet:
Projektnummern 313/S-PPP-6/97 und 313/S-PPP-3/95,
der Henkel KGaA,
der Deutschen Forschungsgemeinschaft: Projektnr. 1012/2-1,
der Europäischen Union für Stipendien an folgende Studenten:

Muriel Nicholas

Tracey A. Garret
 Rachel D. Smith
 Pekka J. Kohonen.

Diese Arbeit wurde durch experimentelle Beiträge der folgenden Personen unterstützt:

Muriel Nicholas	Kinetik Osmium-katalysierter Reaktionen
Tracey A. Garret	Versuche zur Chlornikotinsynthese
Rachel D. Smith	Versuche zur Epibatidinsynthese
Pekka J. Kohonen	Enzymatische Desymmetrisierung
Greta R. Patzke	Metathese bisallylierter Peptide
Vera Neitemeier, Dipl.-Chem.	Bipyridinsynthesen
Christian Kühn, Dipl.-Chem.	Peptidmimetika, Metathese
Dennis K. Ehlert, Dipl.-Chem.	2,6-Disubstituierte Pyridine
Dr. Gunnar Lindberg	Peptidsynthesen
Susanna Lindman	Pharmakologische Assays
Dr. Anders Karlén	Computersimulation
Prof. Claude Piguet	Bindungskonstanten

I. Angiotensin II - Eine γ-Schleife?	7
Peptide und Peptidmimetika	7
Protein, Peptid: Definition	7
Primäre, sekundäre und tertiäre Strukturen	8
Peptidschleifen	9
Was sind Peptidmimetika?	10
Warum Mimetika?	11

Vorgehensweise	11
Das ideale Peptidmimetikum	13
Metabolismus	14
Strukturen und Konzepte	14
Isosterer Austausch	15
Protein-Tyrosin-Kinase (PTK) Inhibitoren	17
Übergangszustandsmimetika	18
Schleifen-Mimetika	20
β -Schleife	20
γ -Schleife	24
Warum Angiotensin II, und nicht I oder III?	29
Aufklärung des RAS-Systemes	29
Biogenese des Angiotensin II	31
Enzymaktive Substanzen	33
ACE-Inhibitoren: Captopril, Enalapril	34
Rezeptoraktive Substanzen	35
Ang II - Zelluläre Wirkungen	35
γ-Schleifen	45
Rahmenverschobene Disulfide	64
Testergebnisse	67
Zusammenfassung	78
II. N-Boc-(2,6-bis-(ethoxycarbonyl-pyridin-4-yl)-alanin	79
III. Geschwindigkeitsbeschleunigung der Dihydroxylierung von Olefinen und OsO₄ durch Druck	92
IV. Synthese chiraler Bipyridyle und ihre Komplexierung	108

V. Experimenteller Teil	117
Spektroskopische Daten unveröffentlichter Verbindungen	119
Literaturliste	127
Stichwort- und Abkürzungsverzeichnis	143

I. Angiotensin II - Eine γ -Schleife?

The tragedy of science - The slaying of a beautiful hypothesis by an ugly fact.

A. Huxley

Peptide und Peptidmimetika

Protein, Peptid: Definition

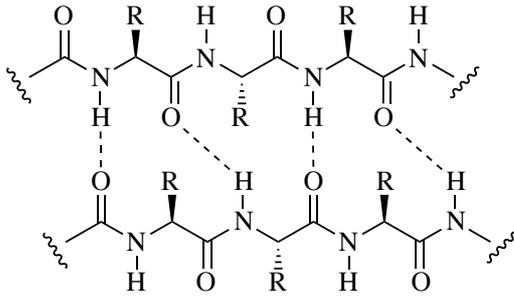
Der Begriff Peptid wurde 1906 durch Emil Fischer geprägt, der ihn aus **Pepton** (griechisch *peptos* = verdaut), den Proteinabbauprodukten des Pepsines und der Endung von Polysaccharid, dies in Analogie zu ihrem Aufbau aus Monomeren, zusammenfügte.¹

“Den Namen Polypeptide habe ich vorgeschlagen für die Produkte, die durch amidartige Verkettung von Aminosäuren entstehen, und deren einfachster Vertreter das Derivat des Glykocolls, das sogenannte Glycyl-glycin, $H_2NCH_2CO-NHCH_2COOH$, ist. Nach der Anzahl der in ihnen enthaltenen Aminosäuren sollen sie als Di-, Tri- Tetra-Peptide usw. unterschieden werden.”

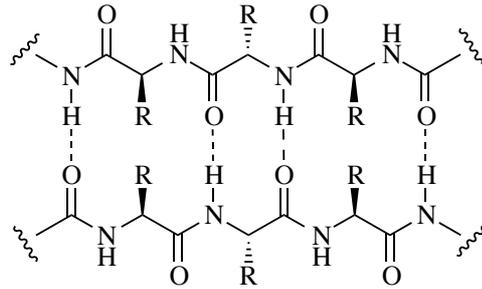
Die Grenze zwischen Peptiden und Proteinen wird bei 50 Aminosäuren definiert, so daß Insulin mit seinen beiden Ketten (21 und 30 Aminosäuren) gerade als Protein betrachtet wird. Natürliche Peptide und Proteine werden durch die DNA-codierten 19 Aminosäuren und die Iminosäure Prolin aufgebaut.

Primäre, sekundäre und tertiäre Strukturen

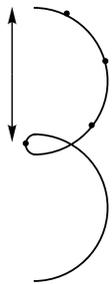
Neben linearen Peptiden werden auch cyclische Peptide unterschiedlicher Ringgröße gebildet. Die Primärstruktur ergibt sich aus der DNA-definierten Reihenfolge der Aminosäuren, die durch die Sequenzanalyse zugänglich ist. Die Struktur dieser Peptide wird durch die Substituenten der Aminosäuren und deren 3-dimensionalen Ausrichtung geprägt.



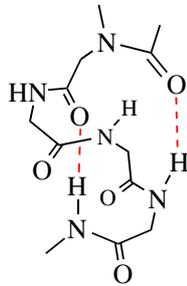
Paralleles β -Faltblatt



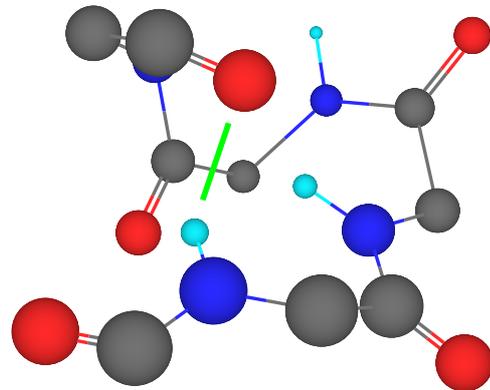
Antiparalleles β -Faltblatt



Ganghöhe h



α -Helix



13-gliedrige Wasserstoffbrücke

Bild 1

Die cis/trans-Amidbindungen bestimmen die Struktur des Peptidrückgrates. Durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Amidbindungen kommt es zur Ausbildung diskreter Motive, die z.B. als β -Faltblatt, α -Helix oder Schleifen bezeichnet werden. Bei

den β -Faltblättern wird zwischen paralleler und antiparalleler Anordnung unterschieden. In der α -Helix wird durch eine Wasserstoffbrücke ein 13-gliedriger Ring gebildet, so daß eine Ganghöhe der Helix von 3,6 Aminosäuren entsteht, hieraus ergibt sich die vollständige Bezeichnung als $\alpha(3.6_{13})$ -Helix.¹ Ähnliche Strukturen sind die 3_{10} -, $\gamma(5.1_{17})$ - und die $\pi(4.4_{16})$ -Helix. Die lipophilen Aminosäuren Alanin (Ala), Leucin (Leu), Methionin (Met), Phenylalanin (Phe), Tryptophan (Trp), Valin (Val) sowie Histidin (His) und Glutamin (Gln) sind helixstabilisierend. Prolin (Pro) und Glycin (Gly) sind Helixbrecher.¹ Die ter-tiäre Struktur der Peptide und Proteine wird durch weitere Wasserstoffbrückenbindungen und *van der Waals*-Interaktionen geprägt. Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den geladenen Aminosäuren Histidin (His), Arginin (Arg), Lysin (Lys), Glutamat (Glu) und Aspartat (Asp) liefern Beiträge von 40-85 kJ/mol zur Konformationsstabilisierung. Die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen Cystein-Seitenketten stabilisiert und fixiert diese 3-dimensionalen Anordnungen (200 kJ/mol).¹

Peptidschleifen

Schleifen sind nach der α -Helix das häufigste Motiv der Proteinstruktur, an ihnen sind im Durchschnitt 1/4 aller Aminosäuren der Proteine beteiligt.² Das bekannte, vermeintlich weitverbreitete β -Faltblatt involviert maximal ein weiteres Viertel der Aminosäuren. Als Peptidschleifen (*turns*) werden Aminosäuresequenzen bezeichnet, in denen das Peptidrückgrat seine Richtung ändert. Die Stabilisierung dieser Schleifen erfolgt meist durch Wasserstoffbrückenbindungen oder Disulfidbrücken.

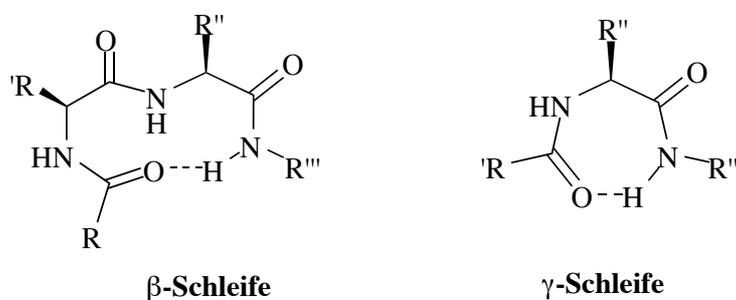


Bild 2

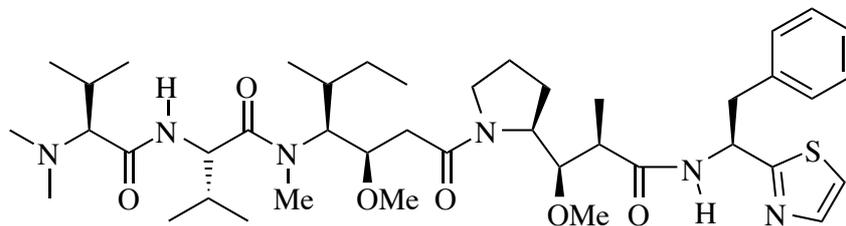
Das häufigste individuelle Schleifenmotiv wird β -Schleife genannt. Während die β -Schleife auf Grund der 4 flexiblen Diederwinkel in verschiedenen Formen auftritt, werden für die seltenere γ -Schleife nur 2 Formen unterschieden, die analog zur Konformationsumwandlung substituierter Cyclohexane miteinander im Gleichgewicht stehen.

Was sind Peptidmimetika?

Peptidmimetika weisen die gleichen Seitenketten und die gleiche 3-dimensionale Struktur wie Peptide auf, ihnen fehlen jedoch einige, oder auch alle Amidbindungen des Peptidrückgrates. Allgemeiner noch: Ein Peptidmimetikum ist jedes Nichtpeptid, das die biologische Wirkung eines natürlichen Peptides durch Bindung an dessen Rezeptor imitiert oder inhibiert.³⁻⁷ Das bekannteste und wohl auch älteste Beispiel für diesen Wirkmechanismus stellen die Opioide dar, die als Mimetika der Endorphine und Enkephaline seit 3500 Jahren in Ge- und Mißbrauch sind.

Weitere bekannte Beispiele für Peptidmimetika sind:

- Erythromycin
- Sulfonylharnstoffe
- Benzodiazepine
- Dolastatin,⁸ in dem eine Reihe peptidmimetischer Konzepte realisiert sind
- im weiteren Sinne auch *D*-Aminosäuren,⁹ die durch posttranslationale Prozesse eingeführt oder aus *L*-Aminosäuren gebildet werden.



Dolastatin 10

Bild 3

Warum binden Mimetika besser?

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

$$\Delta G = - RT \ln K$$

Aus thermodynamischen Gründen¹⁰ können konformationsstabilisierte Peptidmimetika eine höhere Bindung zum Rezeptor aufweisen als das flexible Peptid, weil die Entropieabnahme des Bindungsprozesses um die Entropie der fixierten Freiheitsgrade vermindert ist. Dieses Konzept erfährt jedoch drastische Einschränkungen, denn Bindung allein ist nicht hinreichend für Wirkung: Agonist wie Antagonist können in ähnlicher Weise an den Rezeptor gebunden sein. Auch wenn der kompetitive Antagonist zunächst bessere Bindung aufweist als der flexible Agonist, mangelt es ihm eventuell an weiteren Bindungsstellen zum Rezeptor und damit zur Wirkungsauslösung. Bindet ein Peptid überdies an mehrere Rezeptoren und Rezeptorsubtypen, ergibt sich das Selektivitätsproblem des Mimetikums. Dieser Umstand bietet aber die Chance für eine gezielte Wirkung durch Selektivitätsveränderung.

Vorgehensweise

“In other words, the backbone conformation alone (in the sense of Ramachandran plot for example) is more often than not a sufficient consideration in the design of highly potent and specific peptide ligands”¹¹

Bei der Rezeptor-Erkennung haben *Schleifen*-Motive der Peptide eine tragende Rolle. Dies ergibt sich aus ihrer kompakten Struktur, in der die Seitenketten und die koordinativ ungesättigten Amidgruppen im Raum fixiert sind. Insbesondere diese freien Amid-Bindungen unterscheiden sie von α -Helices und β -Faltblattstrukturen, die häufig durch *Schleifen* in einer Start/Stop Kodierung¹² markiert werden. Überdies tragen sie wesentliche Aufgaben¹³ bei der Proteinfaltung.¹⁴ Verschiedene γ - und β -*Schleifen*, die ein unterschiedliches Maß an Flexibilität aufweisen, können prinzipiell in das gleiche Peptid inkorporiert werden. Computersimulationen dienen zur Selektion derjenigen Mimetika, die die relevanten Konfor-

mationen des natürlichen Peptides einnehmen können. Diese werden durch begleitende Konformationsanalyse mittels NMR oder CD und ORD¹⁵ ermittelt und führen zusammen mit der Simulation zur Auswahl der besten Kandidaten. Ein solcher Ansatz verlangt fortschrittlichste NMR-Spektroskopie und Computersimulation, aber darüber hinaus auch die Entwicklung neuer synthetischer⁴ Methoden. Die Analyse des Peptidrückgrates kann durch Computersimulation in einer Reihe von Kraftfeldern erfolgen: MM+, MM2, MM3, Amber und vielen Weiteren. Semi-empirische oder *ab initio* Methoden sind wegen des hohen Rechenaufwandes für Peptide weniger geeignet. Der Vorteil der MM-Methoden liegt in der hohen Rechengeschwindigkeit und der guten Parameterisierung, die auch die Berechnung polycyclischer Mimetika erlaubt. Ein wesentlicher Nachteil dieser Methoden liegt aber in der Vernachlässigung von Wasserstoffbrückenbindungen. Das *Amber*-Kraftfeld berücksichtigt zwar diese Interaktionen, liefert aber für polycyclische, rigide Systeme ungenaue Werte. Deshalb wurden die folgenden Berechnungen an Gly-Pro-NH₂ mit MM+ durchgeführt. Zunächst wird ein lokales Minimum der Dipeptidstruktur berechnet, dann werden die relevanten Diederwinkel in Teilschritten variiert und anschließend die Anordnungen erneut minimiert. Die berechneten, relativen Energien werden gegen den Diederwinkel aufgetragen (Bild 5).

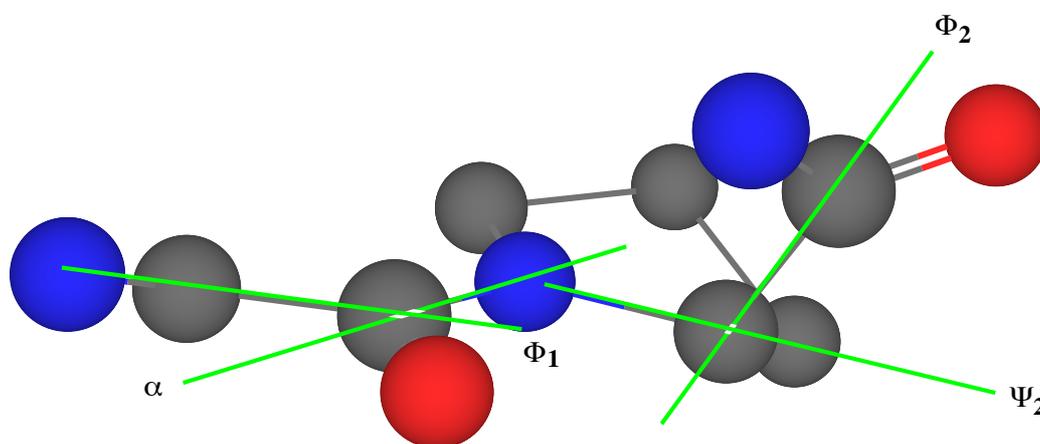


Bild 4 Das Dipeptid Glycin-Prolin, MM+ minimierte Struktur, rot: Sauerstoff, blau: Stickstoff, grau: Kohlenstoff, grün: die Achsen der Diederwinkel α und Φ_1 , Φ_2 , Ψ_2

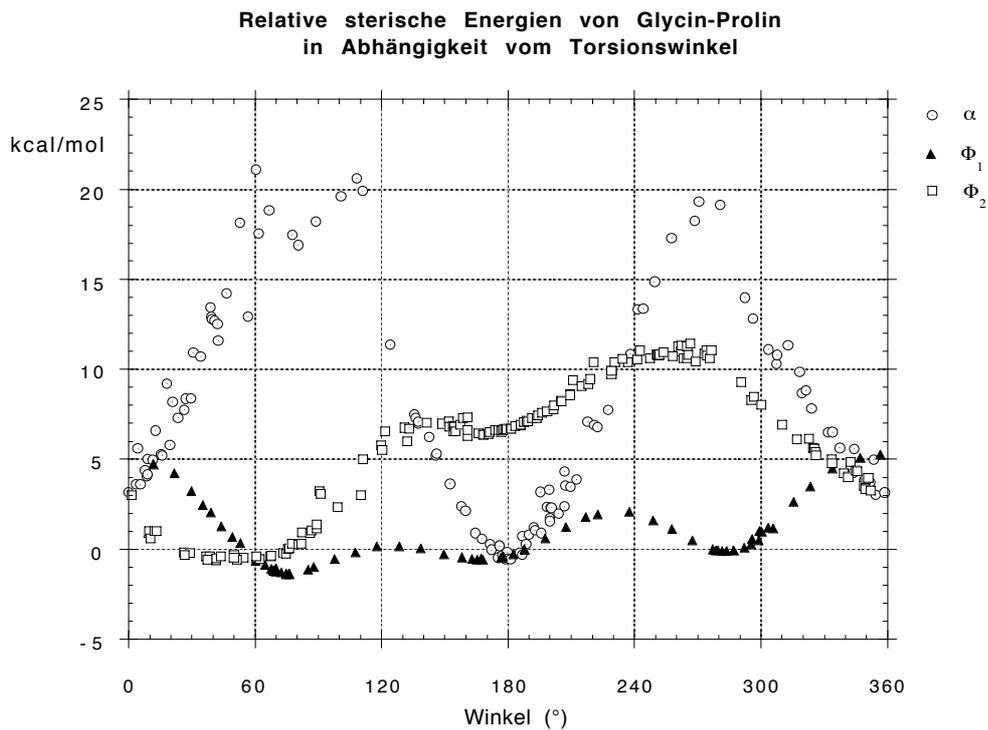


Bild 5 Variation der Diederwinkel α , Φ_1 , Φ_2 im Dipeptid Gly-Pro, relative sterische Energien in kcal/mol

Die Abhängigkeit der Energieminima von den Torsionswinkeln und die große *cis/trans*-Inversionsbarriere (α) zwischen ähnlichen Minima werden an diesem Beispiel eines sekundären Amides sichtbar.

Das ideale Peptidmimetikum⁶

hat:

- eine hohe metabolische Stabilität
- eine hohe Bioverfügbarkeit durch orale Absorption
- eine hohe Rezeptorselektivität und deshalb geringe Nebenwirkungen
- eine hohe Rezeptoraffinität und benötigt deshalb nur geringe Plasmaspiegel
- ein geringes Molekulargewicht und bewirkt deshalb keine immunologische Reaktion

Metabolismus

Mimetika entziehen sich vielfach durch veränderte Konformation (Retro-Amide), *N*-Methylierung, oder auch durch Austausch von Amidbindungen gegen Carboisostere den abbauenden Peptidasen des Magen-Darm-Traktes und sind deshalb, im Gegensatz zu ihren Peptidanaloga, oral applizierbar, wie z.B. die ACE-Hemmer und Imidazol Ang II Antagonisten (DuP 753). Dies gilt eingeschränkt auch für Opiate.

Strukturen und Konzepte

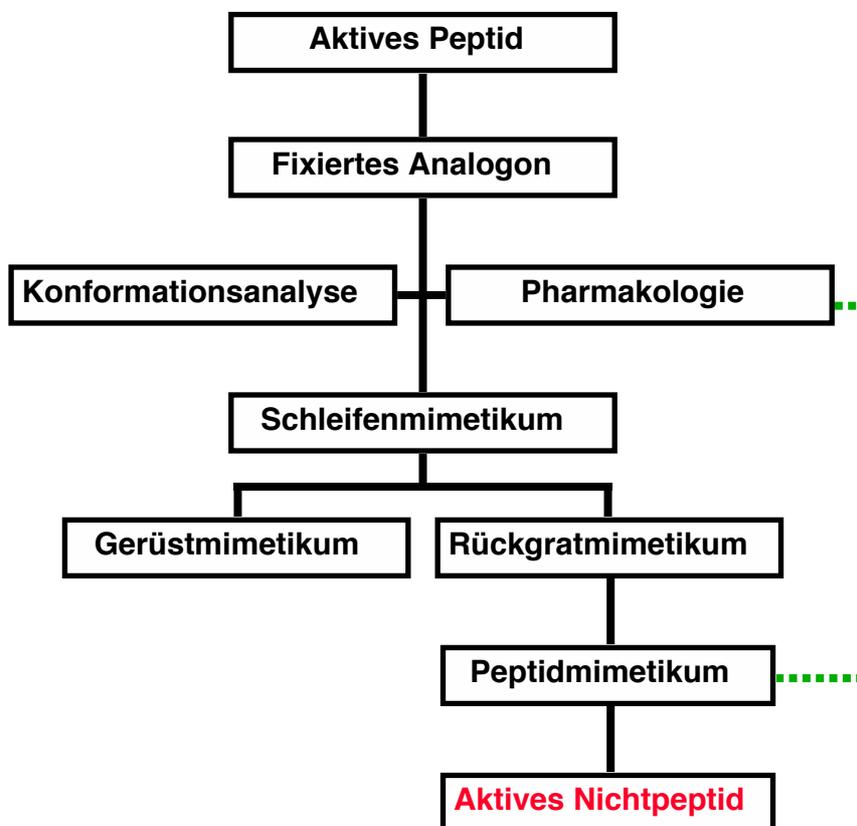


Bild 6

Am Anfang der Entwicklung eines Peptidmimetikums steht in den meisten Fällen ein bekanntes, aktives Peptid. Durch die chemische Fixierung dieses Peptides als Cyclopeptid oder als disulfidverbrücktes Peptid, lassen sich mehrere Derivate darstellen, die in ihrer

konformativen Flexibilität gegenüber dem Stammpeptid eingeschränkt sind. Die Derivate, die weiterhin biologisch aktiv sind, werden einer Konformationsanalyse durch ^1H NMR Spektroskopie und Computersimulation unterzogen. Sind diskrete Schleifenstrukturen an der Präsentation der pharmakophoren Gruppen beteiligt, erfolgt als nächster Abschnitt das Design und die Synthese von Schleifenmimetika.

Isosterer Austausch

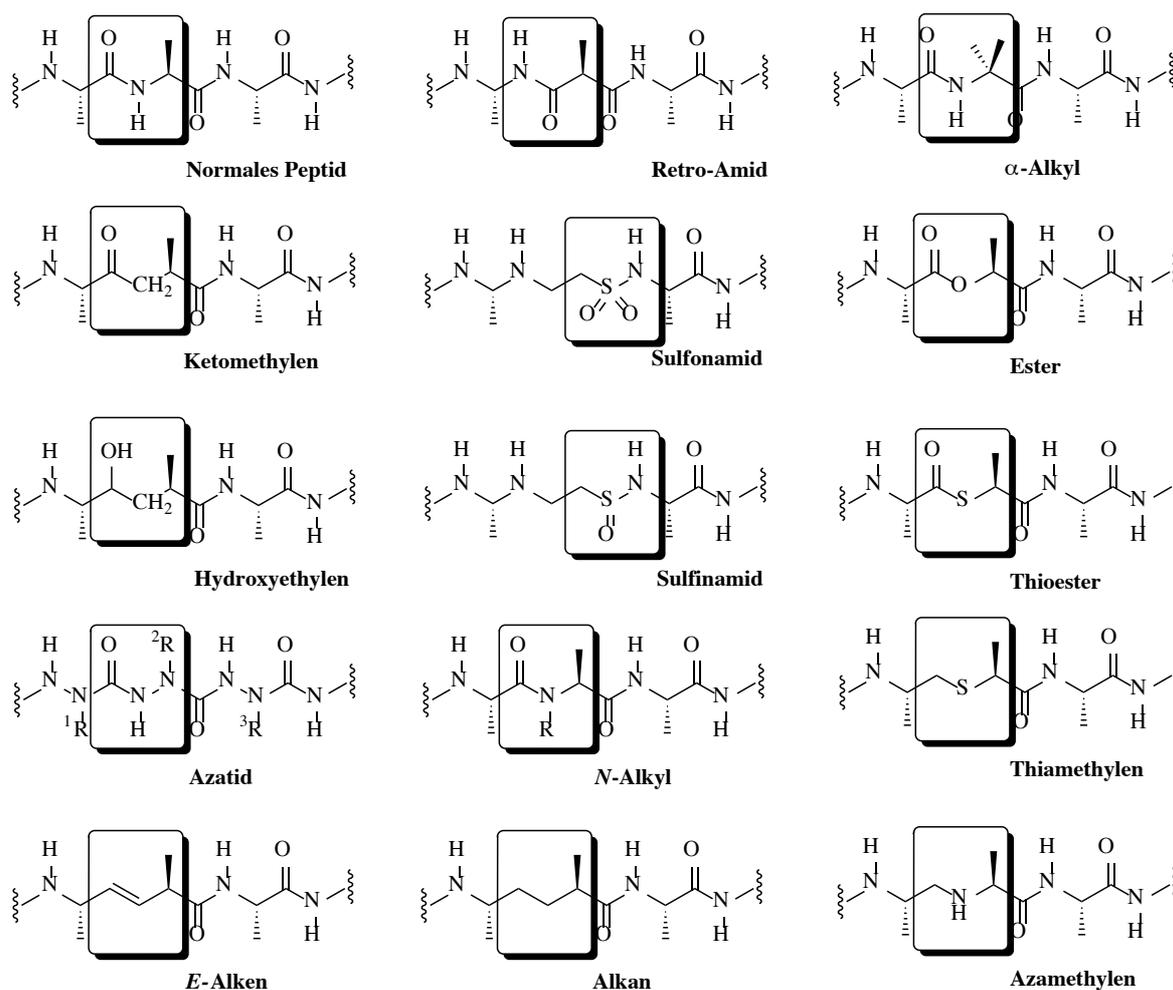


Bild 7 Isostere Amidmimetika: Azamethylen^{16,17}, Hydroxyethylen¹⁸

Hierbei kann zwischen Gerüstmimetika (*scaffold*), die die Pharmakophore in der richtigen Anordnung präsentieren, aber keine Amidbindungen enthalten, und den Rückgratmimetika der Peptidkette unterschieden werden. Ist ein derart abgeleitetes Peptidmimetikum

weiterhin biologisch aktiv, kann in mehreren iterativen Prozessen ein aktives Nichtpeptid erzielt werden. Isostere Peptide basieren auf dem 1,4-Dicarbonylabstand, den alle Peptide gemeinsam haben. Die auszutauschende Einheit muß dabei ähnliche polare Eigenschaften wie die ursprüngliche Amidgruppe aufweisen, ohne jedoch von Proteasen hydrolysiert zu werden. Speziell beim Design von Proteaseinhibitoren wird häufig der sp^3 -hybridisierte Übergangszustand der Hydrolyse zu Grunde gelegt. Derartige, stabile Übergangszustandsmimetika wurden durch den Einbau von Phosphon- und Sulfonsäure (Taurin) ermöglicht. Die notwendigen Ähnlichkeiten in Bindungslänge, 3-dimensionaler Ausrichtung und Polarität wurden durch eine Reihe diverser Isostere erzielt, mit den Retro-Amiden als den naheliegendsten Vertretern. Die Azatide¹⁹ sind bislang nicht durch SPPS zugänglich, können aber durch Flüssigphasensynthese, verankert an Polyethylenglykole, in analoger Weise dargestellt werden. Hierbei wird die übliche Syntheserichtung umgekehrt, man erhält das Peptidmimetikum im Retromodus, beginnend am N-Terminus. Auf diese Weise wurde ein Pentazatid dargestellt, das als Leu-Enkephalinmimetikum (YGGFL) konzipiert wurde. Jedoch fehlte ihm jegliche biologische Aktivität. Die Relevanz dieses Strukturmotives ist noch nicht nachgewiesen.

Ketomethylen-Synthese²⁰

In den Ketomethylen-Isosteren wird die NH-Gruppe gegen eine CH_2 -Einheit ausgetauscht.

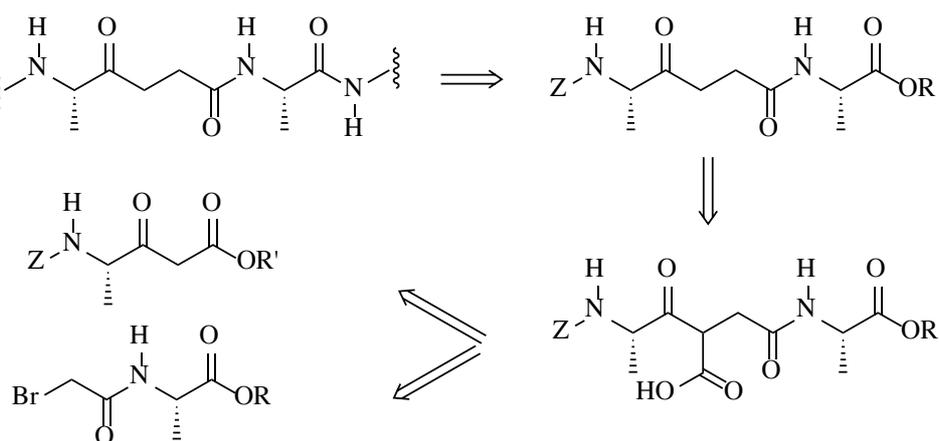


Bild 8

Die Synthese derartiger Mimetika erfolgt durch Umsatz von α -Bromamiden mit dem Anion von β -Ketoestern (Bild 8). Die Esterhydrolyse liefert durch anschließende Decarboxylierung die gewünschten 1,4-Diketone. Sekundäre Bromide werden in dieser Reaktion nur in schlechten Ausbeuten umgesetzt, liefern überdies Diastereomere, die sich nur schwer voneinander trennen lassen. Deshalb ist dieses Verfahren zum Aufbau enantiomeren- oder diastereomerenreiner Mimetika weniger geeignet.

Protein-Tyrosin-Kinase (PTK) Inhibitoren

Die Phosphorylierung von hydroxylierten Aminosäuren durch Kinasen ist ein wesentlicher Schritt biochemischer Signalkaskaden.^{21,22} Die Phosphorylierung von Tyrosylresten in Proteinen spielt dabei eine Schlüsselrolle,²³ die durch die Variation des Phenoles inhibiert werden kann. So führt die Substitution durch Phenylalanin, 4-Methoxyphenylalanin, Tetrafluorotyrosin, Dehydrophenylalanin, β -(4-Pyridyl-1-oxid)-*L*-alanin und *L*-3-Deoxymimosin zu Kinaseinhibitoren.²⁴ Gemeinsames Merkmal dieser Strukturen ist der isostere Austausch von Tyrosin bei gleichzeitiger Verhinderung stabiler *O*-Phosphate. Während Derivate wie Phenylalanin, Fluorpyridylalanin²⁵ und Methoxytyrosin nicht in der Lage sind Phosphate zu bilden, kommt es mit dem hoch aciden Tetrafluorphenol und dem geladenen Pyridin-*N*-oxid²⁵ zur Bildung instabiler Phosphorester.

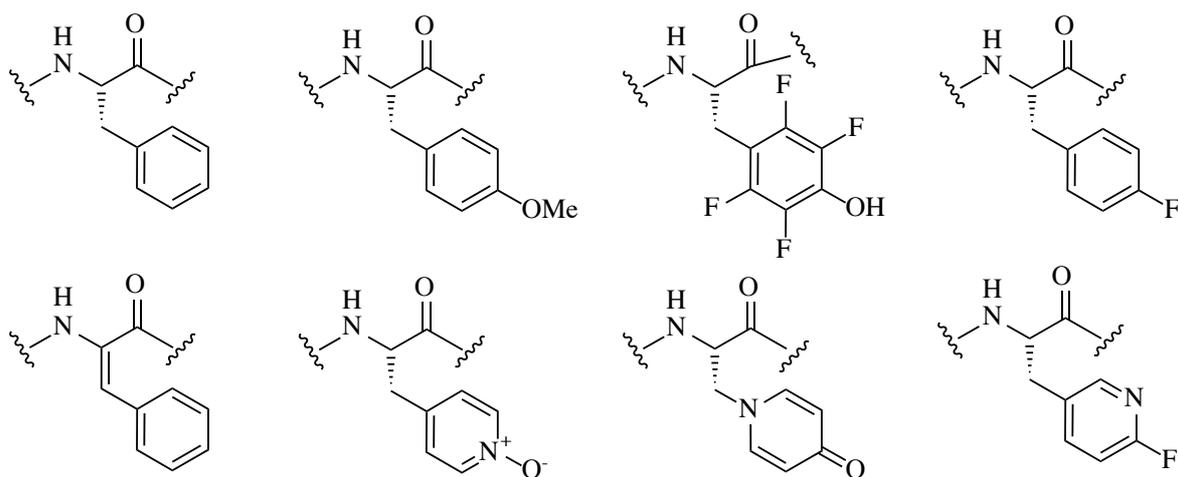


Bild 9 PTK-Inhibitoren

Das 4-Pyrimidinon des Deoxymimosines reagiert bzw. inhibiert in analoger Weise wie das Fluorpyridin durch Aminierung. Der Einbau des *L*-3-Deoxymimosins in die 4-Position von Angiotensin I und nachfolgende Phosphorylierung sollten durch den Aufbau positiver Ladung am Pyridinstickstoff den Angriff benachbarter, nucleophiler Aminosäuren der Proteintyrosinkinase (PTK) auslösen. Die irreversible Anbindung an den Rezeptor durch Lysinseitenketten sollte das Peptidmimetikum als Suizidinhibitor wirksam werden lassen.²⁴ Die Bestätigung dieses Konzeptes hat die Gruppe um M. Cusham bislang nicht berichtet, obwohl das entsprechende Peptid synthetisiert wurde.

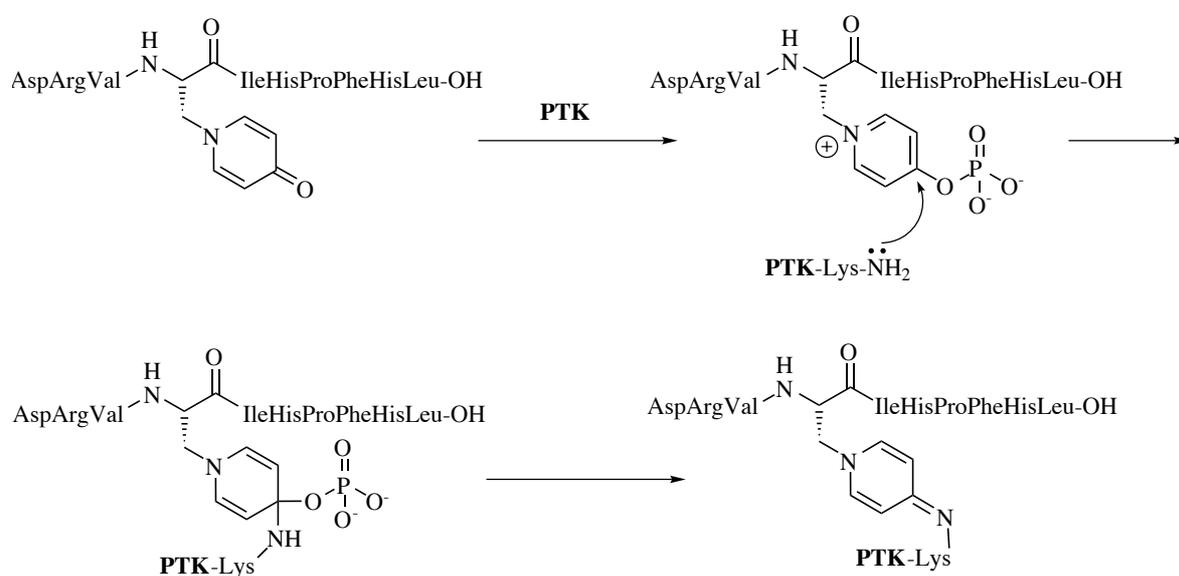
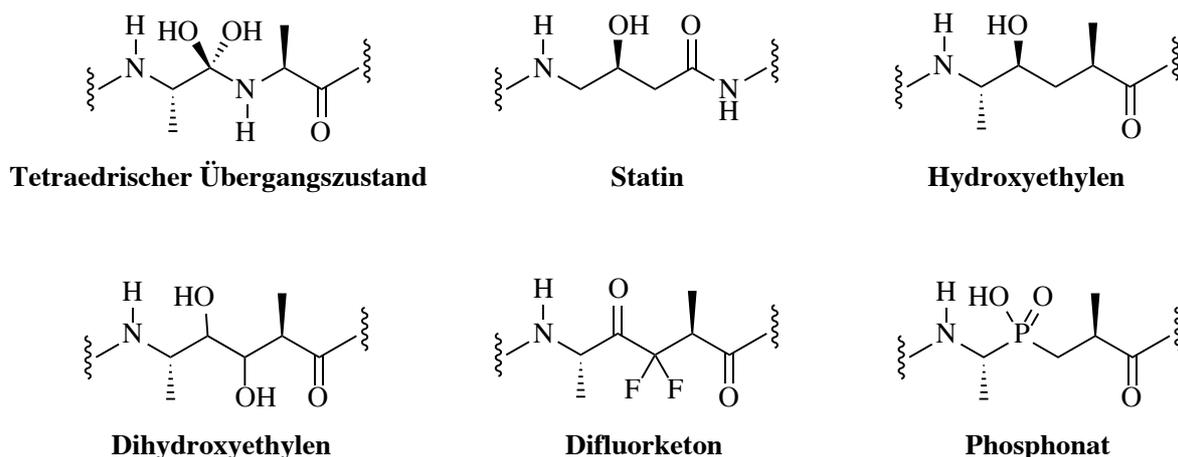


Bild 10 Cushmans Kinase-Inhibitor

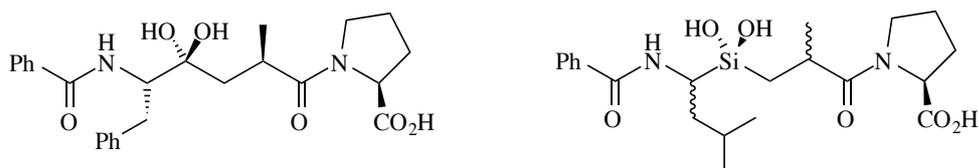
Übergangszustandsmimetika

Die Imitation des tetraedrischen Übergangszustandes der Amidhydrolyse durch Enzyme gibt die Möglichkeit diese Proteasen am Abbau des Substrates zu hindern. Teilweise gelingt sogar die irreversible Inhibition des Enzymes und damit auch der Proteaseschutz endogener Peptide. Mit diesen Ziel wurde eine Reihe von Übergangszustandsmimetika synthetisiert (Bild 11) und in Übersichten zusammengefaßt.^{26,27}

**Bild 11**

Eine neue Klasse von isosteren Peptidmimetika wurde kürzlich von McN. Sieburth et al.²⁸ berichtet. Der Austausch der hydratisierten Ketomethyleneinheit in dem ACE-Inhibitoren durch eine Silandiolmethyleneinheit führte zu den gewünschten Protease-Inhibitoren, jedoch bei deutlich reduzierter Aktivität. Die reduzierte Inhibition wurde auf den gleichzeitigen Austausch des Phenylalanin gegen Leucin zurückgeführt. Die unselektive Synthese lieferte überdies ein Diastereomergemisch mit 3 schwach aktiven Substanzen.

ACE-Inhibitoren



S. McN. Sieburth 1998

Bild 12

FK 506²⁹ ist ein weiterer Naturstoff, in dem ein peptidmimetisches Wirkkonzept realisiert ist. Die Bindung des FK 506 an das *FK-Bindende-Protein* (FKBP) erfolgt durch die Ausbildung einer antiparallelen β -Faltblattstruktur (Bild 13) mit 2 Wasserstoffbrücken-

bindungen. FK 506 bindet dabei durch nichtpeptidische Motive,²⁹ und inhibiert hierdurch die Rotamase.

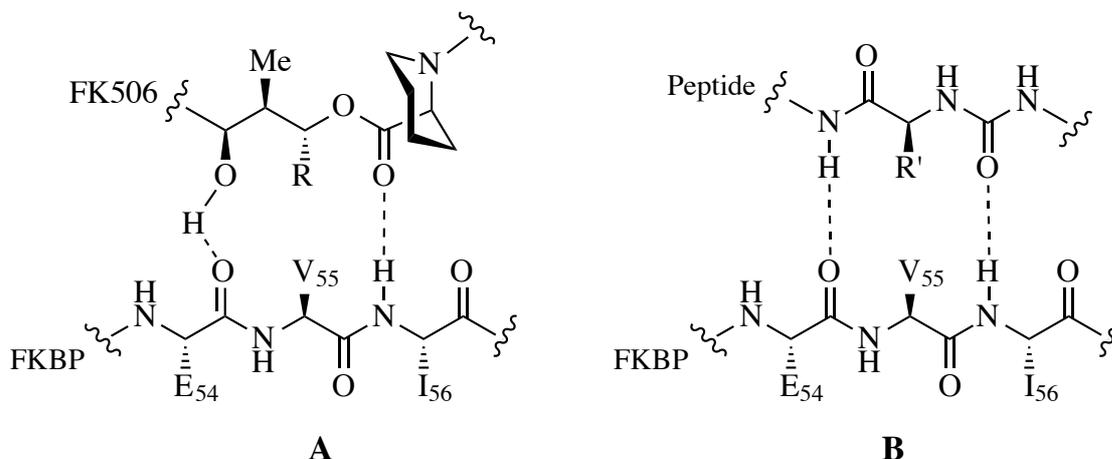


Bild 13 β -Faltblatt des FK 506

Schleifen-Mimetika

β -Schleife - Die Beteiligung von 4 Aminosäuren in der 10-gliedrigen β -Schleife erlaubt eine Reihe von Rückgratkonformationen. Dementsprechend viele, unterschiedliche β -Schleifen wurden definiert und identifiziert. Deshalb sind die eingesetzten Peptidmimetika dieser Motive sehr zahlreich und höchst unterschiedlich. Sie reichen von synthetisch leicht zugänglichen Prolin-*N*-oxiden,³⁰ Heterobicyclen, Kohlenhydraten, Aliphaten bis zu Macrolactamen und komplexen Seitenkettenverknüpfungen.^{4-6,12,13,29,31-42}

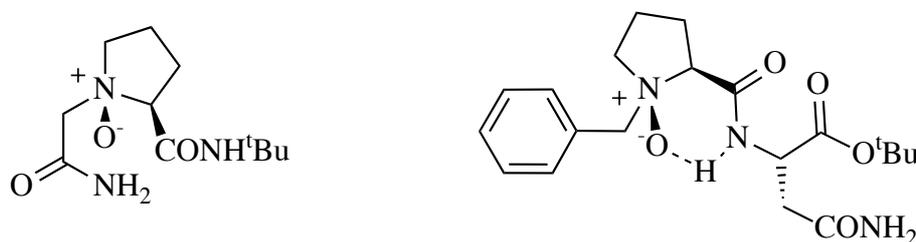
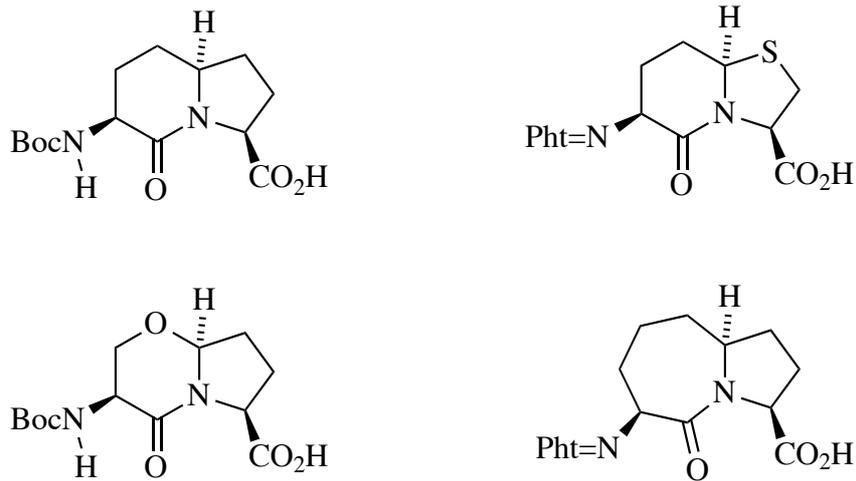


Bild 14 O'Neils Prolin-*N*-Oxide³⁰

**Bild 15**

Ein interessantes Beispiel für rationales Peptidmimetikadesign stammt von R. Hirschmann, K. C. Nicolaou und A. B. Smith,³⁶ die ein substituiertes Tetrahydropyran als zentrales Gerüst ihres Somatostatin β II'-Schleifenmimetikums einsetzen. Ausgehend von β -D-Glucose, bzw. von kommerziellem Tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosylbromid, konnte durch eine selektive β -Glycosidierung mit Tryptophol die erste Aminosäurefunktion eingeführt werden. Hydrolyse der Acetate und selektive Schützung der 6-Position als ^tButyldiphenylsilylether, gefolgt von der Benzylierung der 2-, 3- und 4-Hydroxygruppe und Silyletherspaltung durch Tetrabutylammoniumfluorid ist notwendig zur gezielten Freisetzung der 6-Hydroxygruppe. Die Ethersynthese mit 1-Azidopentyl-5-triflat führt die Lysinseitenkette ein, die durch Staudinger-Reduktion des Azides demaskiert wird. Abschließend erfolgt die Hydrolyse des Sulfonamides zum freien Indol. Die Benzylschutzgruppen wurden nicht entfernt, weil dem 3-Benzylether die Funktion eines Phenylalanins im Trp-Phe-Lys-Mimetikum zukommt.

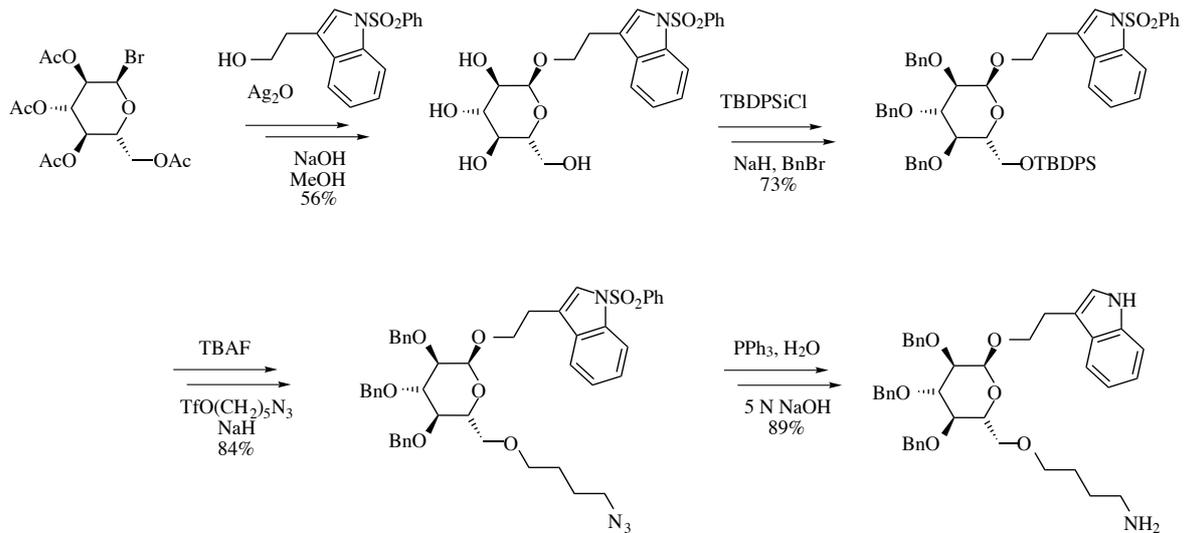
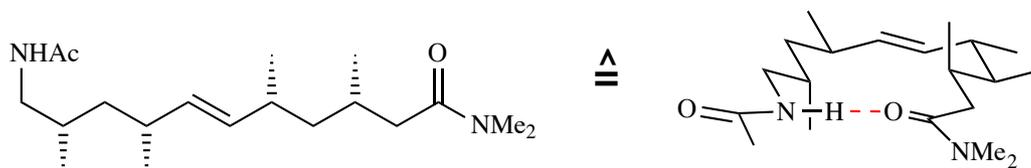


Bild 16 β -Schleifenmimetikum: Nicolaou et al.³⁶

Das rationale Design niedermolekularer Peptidmimetika berichtete R. W. Hoffmann 1997, der ein *trans*-Undec-6-enoat als β II-Schleifenmimetikum synthetisierte (Bild 17). Das auf 2,4-Dimethylpentan basierende Konformationsdesign führte zu einem substituierten, flexiblen Aliphaten, der in Lösung eine β II'-Schleife einnimmt. Die Wasserstoffbrückenbindung wurde durch konzentrationsabhängige IR-Spektroskopie belegt.⁴³



R. W. Hoffmann 1997

Bild 17

Eine Seitenketten-Rückgrat-Cyclisierung benutzten Ellman et al. als Schlüsselschritt in einer β -Schleifen Festphasen-Synthese zur Verwendung in PIN Bibliotheken.⁴⁴ Hierbei wurden alle Synthesen auf Polyethylenstiften (PINs) in 96er Microtiterplatten durchgeführt. Durch die Acetylierung von Rink-verknüpftem Nitrophenylalanin mit Bromessigsäure und

anschließende Aminierung mit Aminoethyldisulfid wurde das sekundäre Amin erhalten, das mit einer Aminosäure und einer weiteren Bromessigsäure verlängert wurde. Durch die reduktive Spaltung des Disulfides und unmittelbar folgende nucleophile Substitution wird der 9-gliedrige Ring geschlossen. Anschließend erfolgt die saure Spaltung der Rink™-Verknüpfung. Die UV-Markierung durch das 4-Nitrophenylalanin diente der Bestimmung der Bindungsaffinität an klonierten fMLF-Rezeptor, der die Neutrophilenaggregation^{45,46} stimuliert.

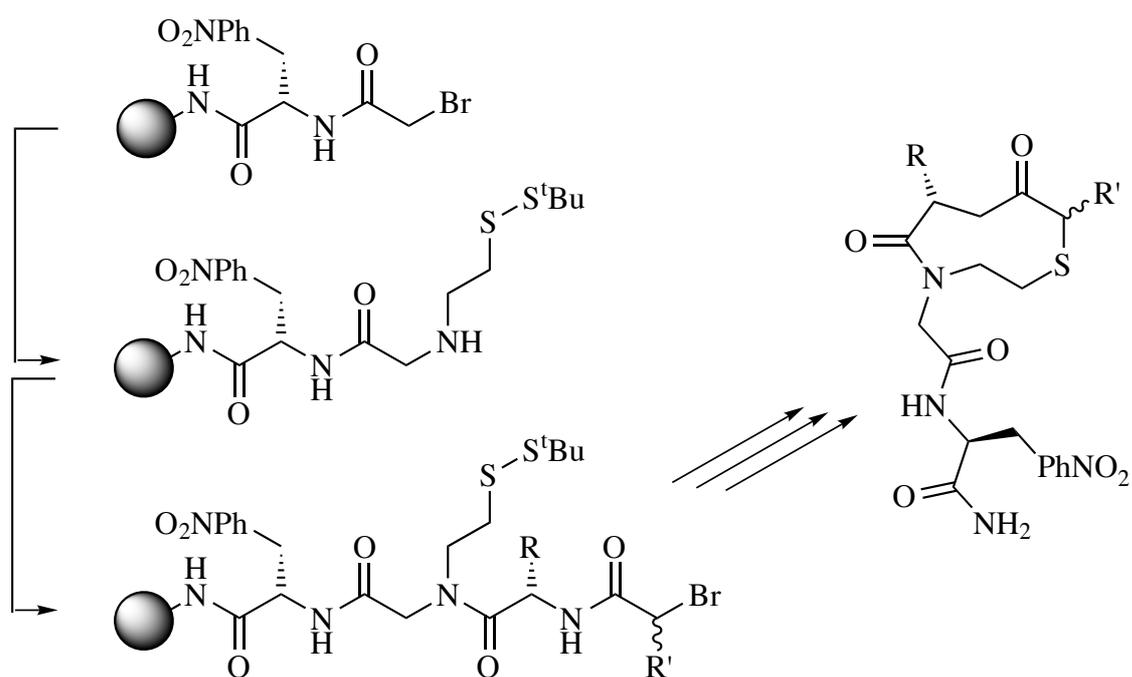


Bild 18 Ellmans PIN Bibliothek

Ein schneller Zugang zu carbocyclischen β -Schleifenmimetika ist durch die Olefin-Metathese⁴⁷ ungesättigter Aminosäuren möglich (Bild 19). Hierzu wurden von Grubbs et al. entsprechende bis-C-allylierte Tetrapeptide durch Metathese mit Ruthenium-Vinylidenkomplexen^{47,48} unter Verlust von Ethylen in die cyclischen Strukturen umgewandelt. Diese Carbocyclen ähneln den Cystein-verbrückten Peptiden, jedoch unterscheiden sie sich im Diederwinkel der verbrückenden Einheit. Während die Disulfide Diederwinkel um 110° aufweisen, führen die cis/trans-Doppelbindungen zu 0° - und 180° -Winkeln. Die Cycli-

sierung dieser Tetrapeptide wird durch die vorhandene β -Schleifenstruktur erleichtert. Bei Einsatz von racemischem *C*-Allylglycin wurde in einer doppelten Diastereoselektion nur das dem *R*-Cystein entsprechende Cyclisierungsprodukt isoliert. Die allylierten, diastereomeren Peptide mit *RR*-, *RS*-, und *SR*-Konfiguration sind zur Ausbildung der β -Schleife nicht befähigt. Sie reagieren durch intermolekulare Metathese zu Polymeren.

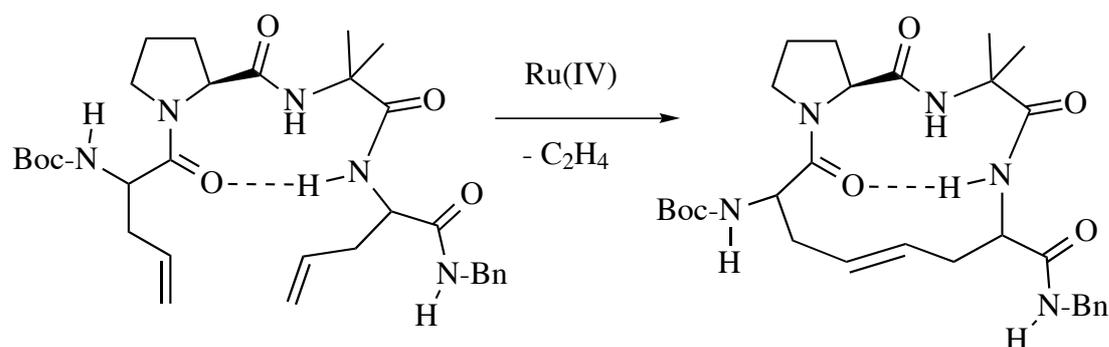


Bild 19

γ -Schleife

Eine γ -Schleife wird aus 3-Aminosäuren derart gebildet^{4,6,12,13,32,38,49-53} (s. Bild 20), daß es zur charakterisierenden Wasserstoffbrücke in einem 7-gliedrigen Ring kommt, die dieses Motiv stabilisiert. Dieses flexible System zeichnet sich durch bestimmte Werte für die Diederwinkel Ψ und Φ aus. Liegen diese innerhalb der Bereiche Ψ : $60-70^\circ$ und Φ : $70-85^\circ$ handelt es sich um eine normale γ -Schleife. Durch Inversion dieses flexiblen Motives wird eine zweite stabile Anordnung erhalten, die sich nur durch die Vorzeichen der Winkel unterscheidet: Ψ : $-60-70^\circ$ und Φ : $70-85^\circ$. Diese Struktur wird als inverse γ -Schleife definiert. Für dieses Schleifenmotiv wurde inzwischen eine Reihe von Mimetika entwickelt (2-7), z.B. die β -Aminosäure **2**, basierend auf einer Glucosestruktur, durch H. Kessler et al.⁵⁴ und die Cyclopropylaminosäuren wie **3** durch K. Burgess⁵⁵ und S.F. Martin.⁵⁶ Neuere γ -Schleifenmimetika wurden von D.P. Curran⁵⁷ (**4**) und P. Somfai/J. Kihlberg⁵⁸ (**6**: inverse

γ -Schleife) berichtet, die erfolgreiche Inkorporation dieser Mimetika in Peptide steht aber noch aus. Die bislang erfolgreichsten γ -Schleifenmimetika stammen von Olson⁵⁹ (**5**) und Huffman (**7**).^{49,60,61} Insbesondere das Cyclohexan **5** ist ein erfolgreiches Gerüstmimetikum des Thyrotropin-freisetzenden Hormones. Die beiden letztgenannten Mimetika entspringen grundsätzlich verschiedenen Ansätzen, während **5** nur die 3-dimensionale Ausrichtung der Pharmakophore anstrebt, werden in **7** die Diederwinkel einer γ -Schleife in nahezu idealer Weise fixiert. Obwohl **5** eine hohe Bindungsaffinität an den Rezeptor des TRH aufweist und TRH eine γ -Schleife am Rezeptor einnimmt, ist **5** dennoch kein gesichertes γ -Schleifenmimetikum, da es an einer zweiten Bindungsstelle des Rezeptoren wechselwirkt.⁵⁹

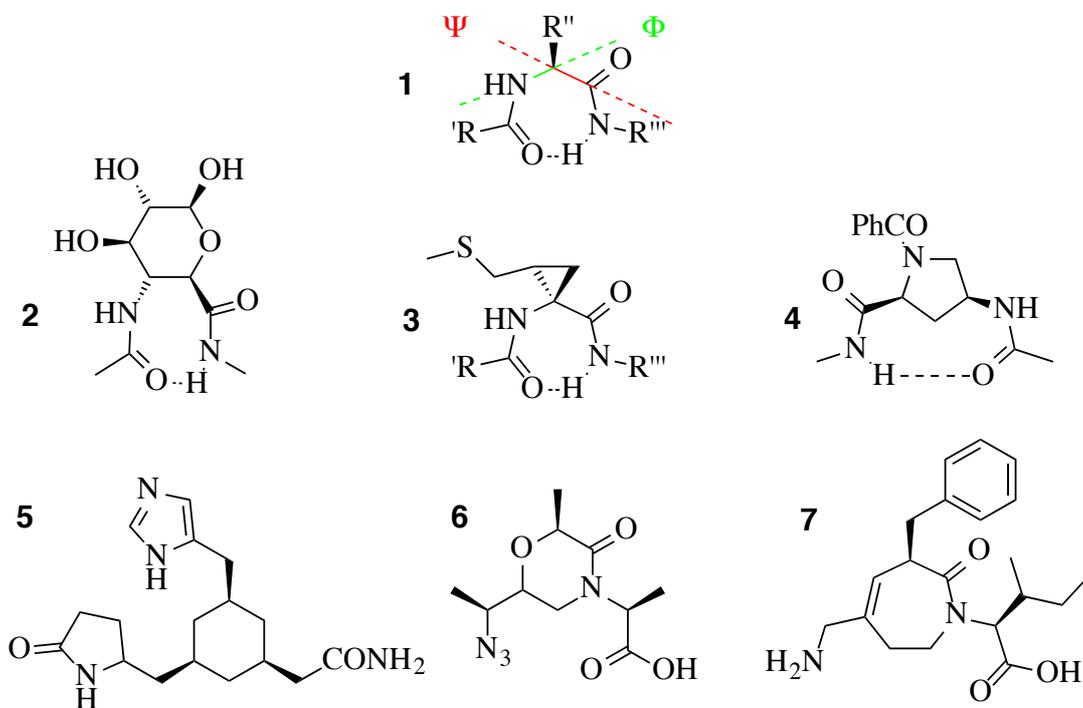
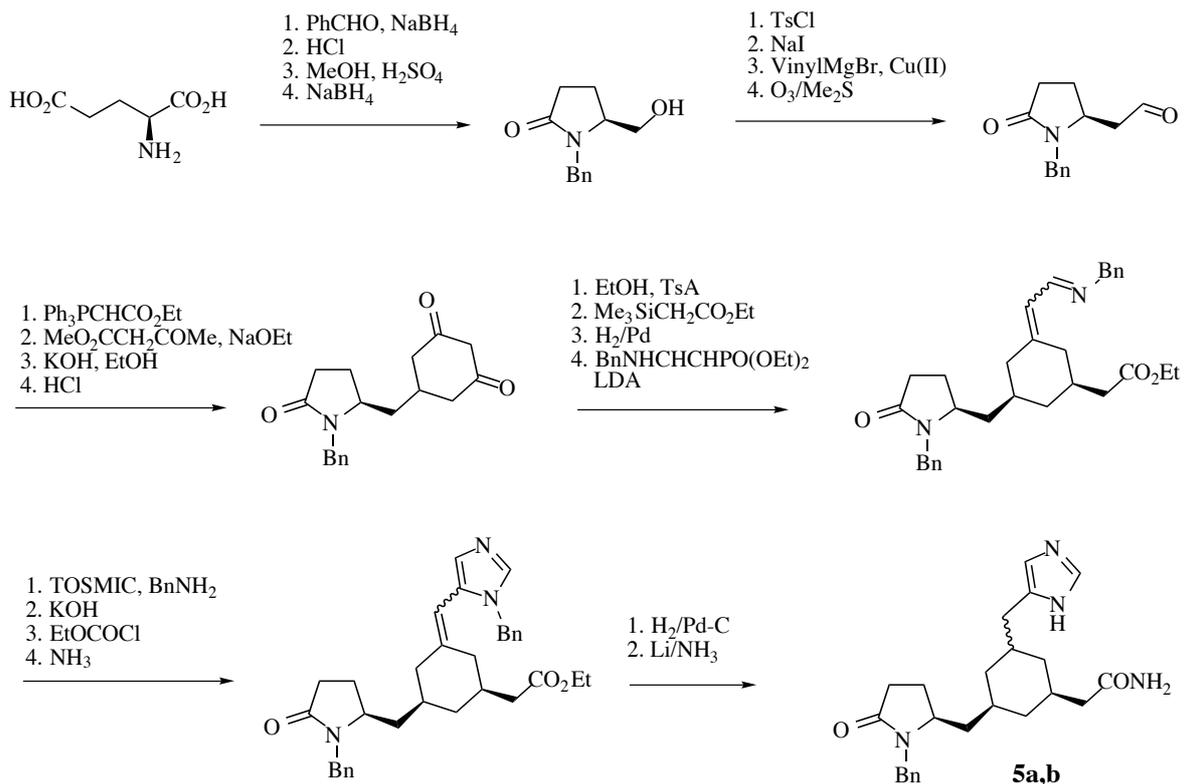


Bild 20 Kessler⁵⁴, 3 Burgess^{62,63}, 4: Curran⁵⁷, 5: Olson⁵⁹, 6: Somfai/Kihlberg⁵⁸, 7:Huffman^{31,50,64}

**Bild 21**

Die 22-stufige Synthese des TRH-Mimetikums⁵⁹ verwendet *L*-Glutarsäure als Startmaterial, das nach Überführung in den *N*-Benzyl-*pyro*-glutarsäuremethylester durch NaBH₄ reduziert wird. Der erhaltene Alkohol wird nach Tosylierung und Iodidaustausch mit Vinylgrignard verlängert, anschließend wird die Doppelbindung zum Aldehyden abgebaut. Der erhaltene Aldehyd wird in einer Wittig-Reaktion zum Acrylester verlängert und anschließend in einer Michael-Addition mit Acetessigsäuremethylester umgesetzt. Durch Dieckmann-Kondensation und Decarboxylierung wird mit dem 1,3-Cyclohexandion das Grundgerüst aufgebaut. Die Glycyl-Seitenfunktion wird am Ketoenolether durch eine Peterson-Olefinierung vorbereitet. Nach diastereoselektiver Hydrierung der Doppelbindung (de = 88%) folgt der Aufbau der Histidyl-Funktion durch Horner-Emmons-Reaktion und *p*-Toluolsulfonylmethylisocyanid (TOSMIC). Die Hydrolyse des Esters, gefolgt von Aktivierung und Reaktion mit Ammoniak gibt das Amid, abschließend wird die Doppelbindung hydriert und das Imidazol durch eine Birch-Reduktion debenzyliert. Das Mimetikum wird als Diastereomengemisch **5a,b** erhalten (de = 57-80%).

Die Angiogenese (Neovascularisation) ist von fundamentaler Bedeutung von pathologischen Vorgängen und ein neues Therapieziel für Tumorstatika. Essentiell für diesen Vorgang ist die Integrin-vermittelte Adhäsion von Endothelzellen an die extrazelluläre Matrix durch Integrine, wie das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (Vincronectinrezeptor).⁶⁵ Wird das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin mit Arg-Gly-Asp (RGD)-Liganden antagonisiert, bleibt die Angiogenese aus. Ein derartiges RGD-Peptid mit hoher Affinität und Selektivität ist das *cyclo*(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val) [c(RGDFV)] (Bild 22). K.C. Nicolaou et al. benutzten wiederum ihre Synthesestrategie für $\beta_{II'}$ -Schleifen-Somatostatinmimetika (Bild 16), in diesem Fall jedoch zur Synthese eines γ -Schleifenmimetikums. Die Verbindungen waren jedoch inaktiv an $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin. Das Ausbleiben der biologischen Aktivität wurde mit zu hoher konformativer Stabilität des Gerüstmimetikums begründet.⁶⁶

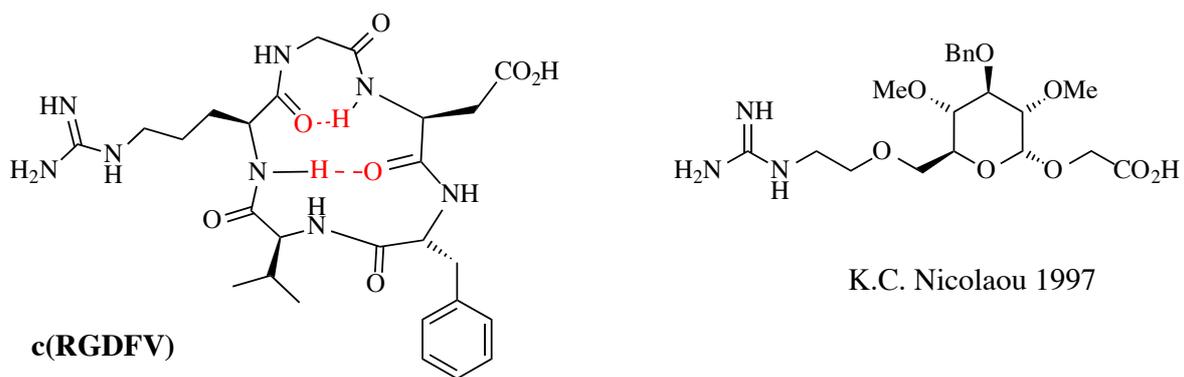


Bild 22 $\alpha_v\beta_3$ -Integrin Antagonisten

Die Arbeitsgruppe von J.F. Callahan und W. F. Huffmann bei SmithKline Beecham nutzte einen gemeinsamen Vorläufer für die Synthese von γ - und β -Schleifenmimetika. So konnte der γ,δ -ungesättigte Aldehyd in ein γ -Schleifenmimetikum und ein β_{III} -Schleifenmimetikum des Enkephalin und weitere γ -Schleifenmimetika überführt werden.^{31,49,50,61} Der Aldehyd ist durch Birch-Reduktion und folgende Ozonolyse der elektronenreicheren Doppelbindung zugänglich. Eine reduktive Aminierung mit NaBH₃CN führt die Aminosäureester ein. Die Hydrolyse des Methylesters und Aktivierung der freien Säure führen

dann zum Ringschluß. Die Hydroxymethylgruppe wird durch eine Gabriel/Mitsunobu-Sequenz in das Amin überführt und abschließend mit Aminosäuren kondensiert.

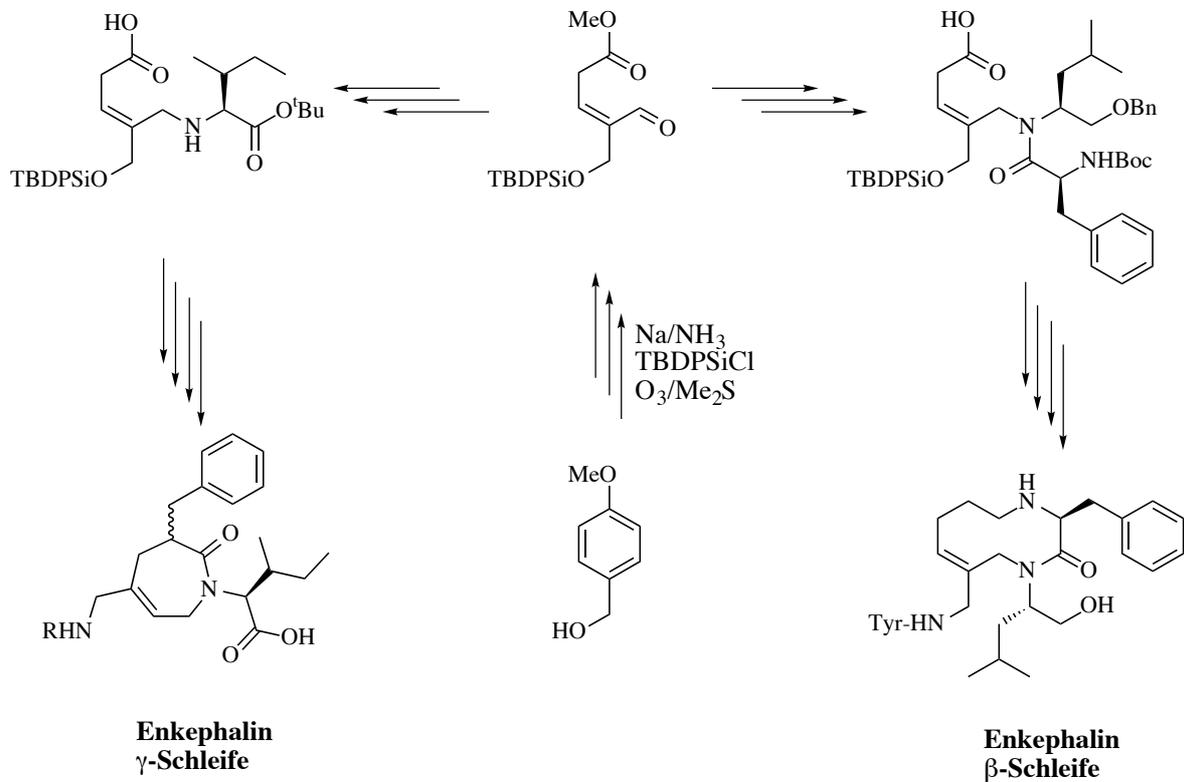


Bild 23

Weitere, ähnliche γ -Schleifenmimetika (Bild 24) dienen als Fibrinogen-Rezeptorantagonisten⁶⁷ (**I**, **II**) und als HIV Proteaseinhibitor (**III**).⁶⁴

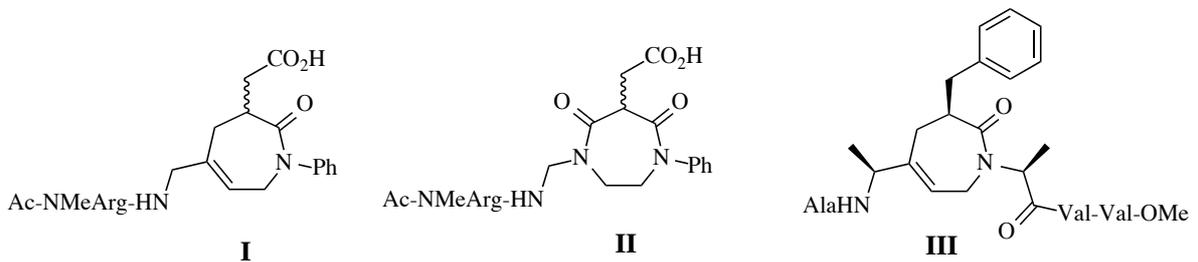
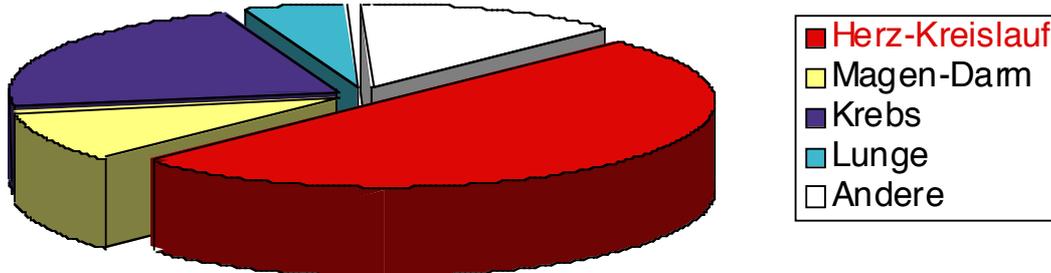


Bild 24

Warum Angiotensin II, und nicht I oder III?

Laut dem Statistischen Bundesamt waren 1993 50% der Todesfälle auf Herz-Kreislaufkrankheiten zurückzuführen. Die wesentliche Ursache war Bluthochdruck. Das Renin-Angiotensin System (RAS), das auf den nächsten Seiten erläutert wird, übernimmt die Hauptrolle der Blutdruckregulation durch die Kontrolle der Vasokonstriktion und des Wasserhaushaltes. Es ist deshalb das Schlüsselsystem zur Therapie malignen Hochdrucks. Die immense Fallzahl der Herz-Kreislauf-Störungen, z.B. Hochdruck und Insuffizienz, hat makroökonomische Konsequenzen.

TODESURSACHEN 1993



Quelle: Statistisches Bundesamt

Bild 25

Aufklärung des RAS-Systemes

Dies führt wiederum zu großem Interesse an diesem System und entsprechendem Forschungsaufwand. Die nunmehr 100-jährige Aufklärung des Renin-Angiotensin-System (RAS) hat inzwischen zu einem detaillierten Verständnis geführt. Beginnend mit der Isolation des Renins aus Kaninchennieren-Extrakten durch Tiegerstedt und Bergmann 1898 und dem Nachweis seiner blutdrucksteigernden Wirkung, wurde schließlich 1940 die

enzymatische Aktivität des Renins entdeckt. Page/Helmer und Braun-Menéndez isolierten gleichzeitig die Abbauprodukte des Angiotensinogens, die sie Hypertensin und Angiotonin nannten. Als Mitte der 50er-Jahre bekannt war, daß diese Peptide identisch waren, wurde der Name zu Angiotensin fusioniert. Zu diesem Zeitpunkt war auch der Zusammenhang der beiden ersten Angiotensine I und II bekannt (Ang I + Ang II). 1965 wurden an einer brasilianischen Universität⁶⁸ blutdrucksenkende Peptide aus Schlangengiften isoliert, die die hypotensive Wirkung des Nonapeptides Bradykinin verstärken. 3 Jahre später wurde das Enzym ACE isoliert, das in Säugetieren Ang I in Ang II umwandelt. Als diese zusammenhanglosen Untersuchungen durch Hochschularbeiten in den USA, GB und Brasilien verglichen wurden, zeigte sich, daß die wirksamen Enzyme identisch waren, und mit den isolierten Schlangenpeptiden die ersten ACE-Inhibitoren zur Verfügung standen. Die Nachweise, daß es sich bei ACE um eine Metallaprotease handelt, sowie der Zink-Bindungsstellen, weckte dann endlich das Interesse der pharmazeutischen Industrie, die das Potential eines neuen Blutdrucksenkers sah. Squibb entwickelte mit Captopril das erste ACE-inhibierende Pharmakon. Wenig später folgte jedoch das verbesserte Enalapril, dem mit der Thiolgruppe auch die meisten Nebenwirkungen abhanden kamen. Die Substanz ist heute noch unter den *Top 10* der meistverkauften Pharmaka. *“Es ist eines der zahllosen Beispiele dafür, daß zweierlei unbedingt notwendig ist: hochwertige, langfristige Grundlagenforschung durch einzelne Hochschulwissenschaftler und die Fähigkeit der Industrie, durch ihre Forschungsarbeit diese Grundlagenforschung in Produkte von sozialem Wert umzusetzen.”*⁵ 1975 waren schließlich die ersten Renin-Inhibitoren bekannt, die aber bis heute nicht zur Entwicklung von Pharmaka geführt haben.

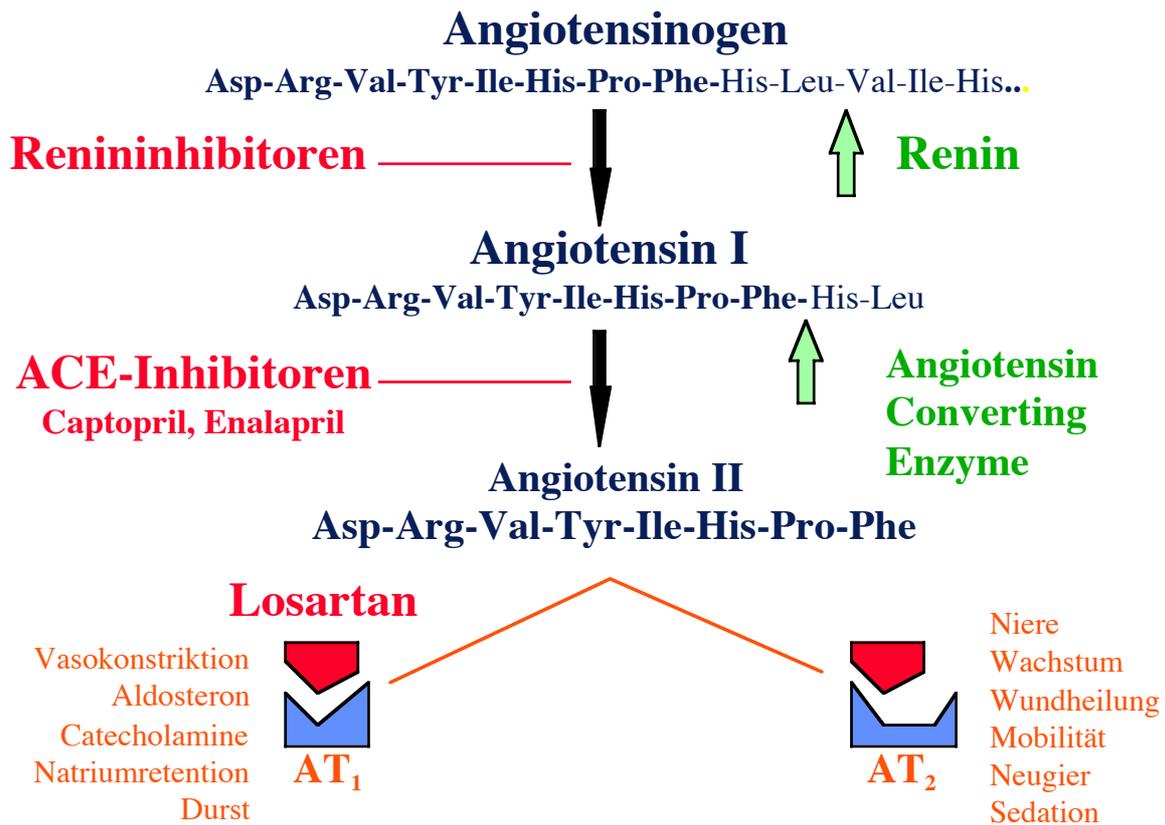


Bild 26 RAS System

Biogenese des Angiotensin II

Die Biosynthese von Ang II beginnt in der Leber oder Niere mit der Synthese des Angiotensinogens, einem Protein von 60 kDa Masse. Die Transskription des Angiotensin-Genes in mRNA ist zumindest in der Niere stark vom Salzhaushalt abhängig. Genetisch bedingte Überexpression führt zu entsprechend hohen Angiotensinogenwerten, die die übliche Konzentration von $1\ \mu\text{M}$ übersteigen. Nach Abgabe in die Blutbahn wird Angiotensinogen in der Niere durch die Aspartylprotease Renin zum Decapeptid Ang I hydrolysiert. Dieses Decapeptid ist Substrat für mehrere Protein-Tyrosyl-Kinasen (PTK).^{24,69} So führen steigende NaCl-Konzentrationen zur Inhibierung von Thymus-Serin-Kinasen, stimulieren aber die Phosphorylierung von Ang I durch Thymus-PTK. Die Funktion dieser Phosphorylierung ist jedoch unbekannt. Die Abspaltung des 9,10-Dipeptides His-Leu zu

Ang II erfolgt überwiegend in der Lunge durch das *Angiotensin-Converting-Enzyme* (ACE), einer Carboxypeptidase. Der Abbau durch das unspezifische ACE, das mit der Kininase II identisch ist, stoppt am Phenylalanin, weil ACE Prolin als vorletzte Aminosäure nicht toleriert. Insgesamt werden aber bei der Langzeit-ACE-Hemmung nur 30 % der Angiotensin II-Bildung blockiert.⁷⁰ Parallele Reaktionskaskaden und ein direkter Abbau des Angiotensinogen zu Ang II umgehen die ACE-Inhibition. Die Abspaltung von Phenylalanin durch andere Peptidasen liefert Ang III, dessen Rezeptoren überwiegend im Gehirn angesiedelt sind.

Ang II ist die drittstärkste blutdrucksteigernde Substanz, nach EDRF (*endothelium derived relaxing factor*, besser bekannt als: NO) und Endothelin. Dies erfolgt durch die Gefäßverengung und die indirekte Kontrolle des Wasserhaushaltes durch die Freisetzung von Aldosteron. Andere Effekte sind:

- Freisetzung von Catecholaminen aus dem Nebennierenmark
- Stimulierung der Glykogenolyse der Leber
- erhöhte Prostaglandinsynthese⁷¹
- erhöhte Resorption von Na⁺ in der Niere
- Uterus-Kontraktion, Ovulations-Stimulation
- Freisetzung von Vasopressin und ACTH (adrenocorticotropes Hormon)
- die selbstregulatorische Hemmung der Reninfreisetzung, mit der es seine eigene Biosynthese kontrolliert
- Angiogenese^{65,72,73}
- Apoptose⁷⁴
- cardiale Fibrose, die durch verringerte Kontraktilität und den beschleunigten Metabolismus und erhöhten Sauerstoffverbrauch zu ventrikulärer Unterfunktion führt⁷²
- Hypertrophie durch Endothelin-Stimulation⁷²

Gerade die letzten Mechanismen erklären die Nebenwirkungen der kommerziell erfolgreichen ACE-Inhibitoren, die wahllos alle Ang II modulierten Systeme betreffen. Wünschenswert sind lediglich Kontrolle der Vasokonstriktion und des Wasserhaushaltes. Derzeit werden die meisten Effekte dem AT₁ Rezeptoren⁶ zugeschrieben, dennoch sind selektive Antagonisten für die bislang identifizierten Ang II Rezeptoren: AT_{1A}, AT_{1B}, AT_{1C}, AT₂, AT₃ (und AT₄) dringend erforderlich.^{75,76} Die Nomenklatur der Angiotensin II

Rezeptoren wird definiert durch das amerikanische *High Blood Pressure Council*, die Unterscheidung der Rezeptoren erfolgt durch selektiv bindende Substrate wie Losartan, PD123,177 (Bild 30) oder desaktivierende Reagenzien,⁷⁷ wie Dithiothreitol (*threo*-1,4-Dimercapto-2,3-butandiol).

Enzymaktive Substanzen

In der Therapie der Hypertonie werden mehrere Konzepte angewendet. Die beiden Angiotensin II vermittelten Therapien basieren auf Enzym- oder Rezeptorinhibition. Die ACE-Inhibitoren: Captopril und Enalapril inhibieren diese zinkhaltige Metallprotease durch Ausbildung stabiler Bindungen zwischen Substrat und Metall. Allgemein werden die ACE-Inhibitoren in 3 Klassen⁷⁸ eingeteilt (Bild 27):

- Mercaptane wie Captopril
- Prodrug-Carboxylate wie Enalapril (hydrolysiert *in vivo* durch hepatische Esterasen zum Enalaprilat) und Quinapril
- Phosphinate wie Fosinopril

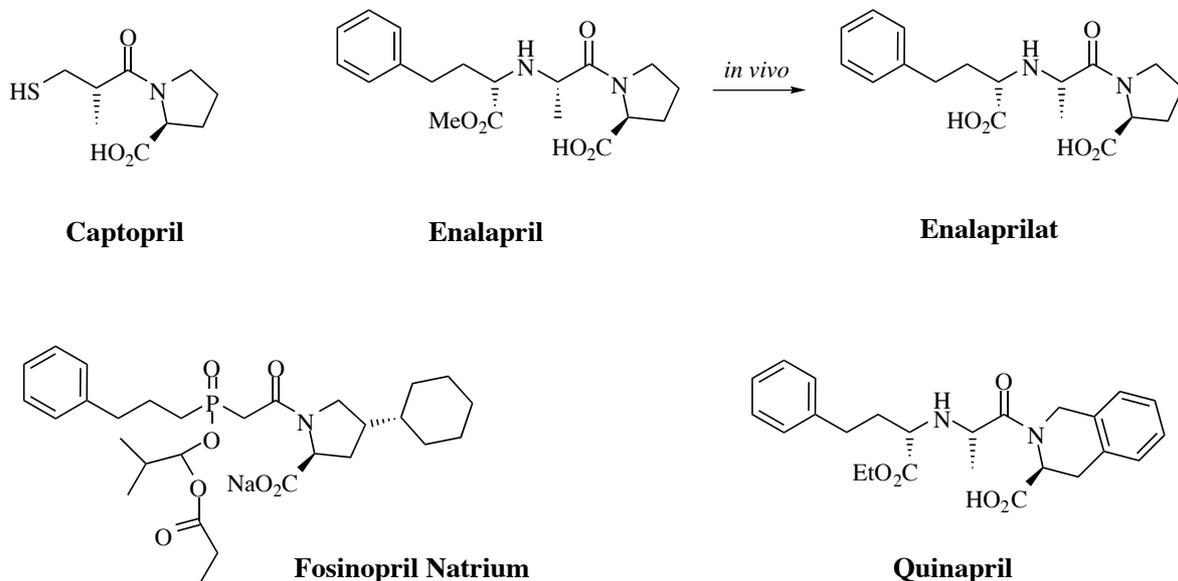


Bild 27 ACE-Inhibitoren⁷⁸

So wird auch die Carboxypeptidase A, deren katalytisches Zentrum dem von ACE ähnelt, durch Zink-koordinierende Schwefel- oder Carboxylatgruppen inhibiert. Entscheidend ist die fixierende Interaktion mit mehreren Aminosäuren des Enzymes, die das Substrat für die Aktivierung durch Zink in der richtigen Anordnung konfigurieren. Wird der sp^3 -konfigurierte Zink-Orthoester durch stabilere Zink-Mimetikum-Bindungen ersetzt, dann bindet das Mimetikum kompetitiv oder irreversibel an das aktive Zentrum.

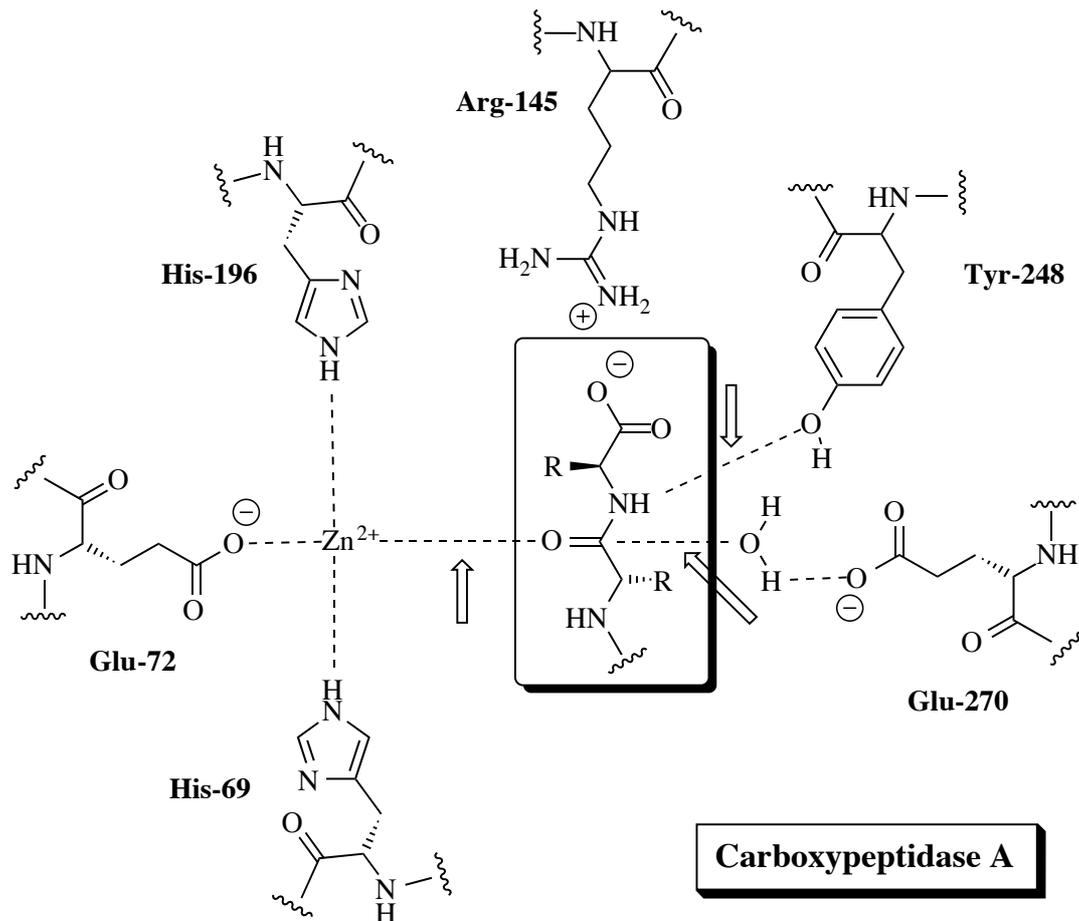


Bild 28 Carboxypeptidase A

Durch die irreversible oder kompetitive Inhibition von ACE wird der Plasmaspiegel von Ang II reduziert, weil aber zusätzliche Reaktionswege zur Bildung von Ang II führen, läßt sich der Plasmaspiegel von Ang II durch ACE-Inhibitoren nur um 30% senken. Überdies sind der AT_1 und der AT_2 durch diese unspezifische Reduktion in gleicher Weise betroffen.

Rezeptoraktive Substanzen

Ang II - Zelluläre Wirkungen

Die Pharmakologie und die Struktur des AT₁ Rezeptoren sind bekannt und wurden in zahlreichen Übersichtsarbeiten zusammengefaßt.^{77,79-85} Die Rezeptoren zeichnen sich durch folgende Effekte aus:

AT₁

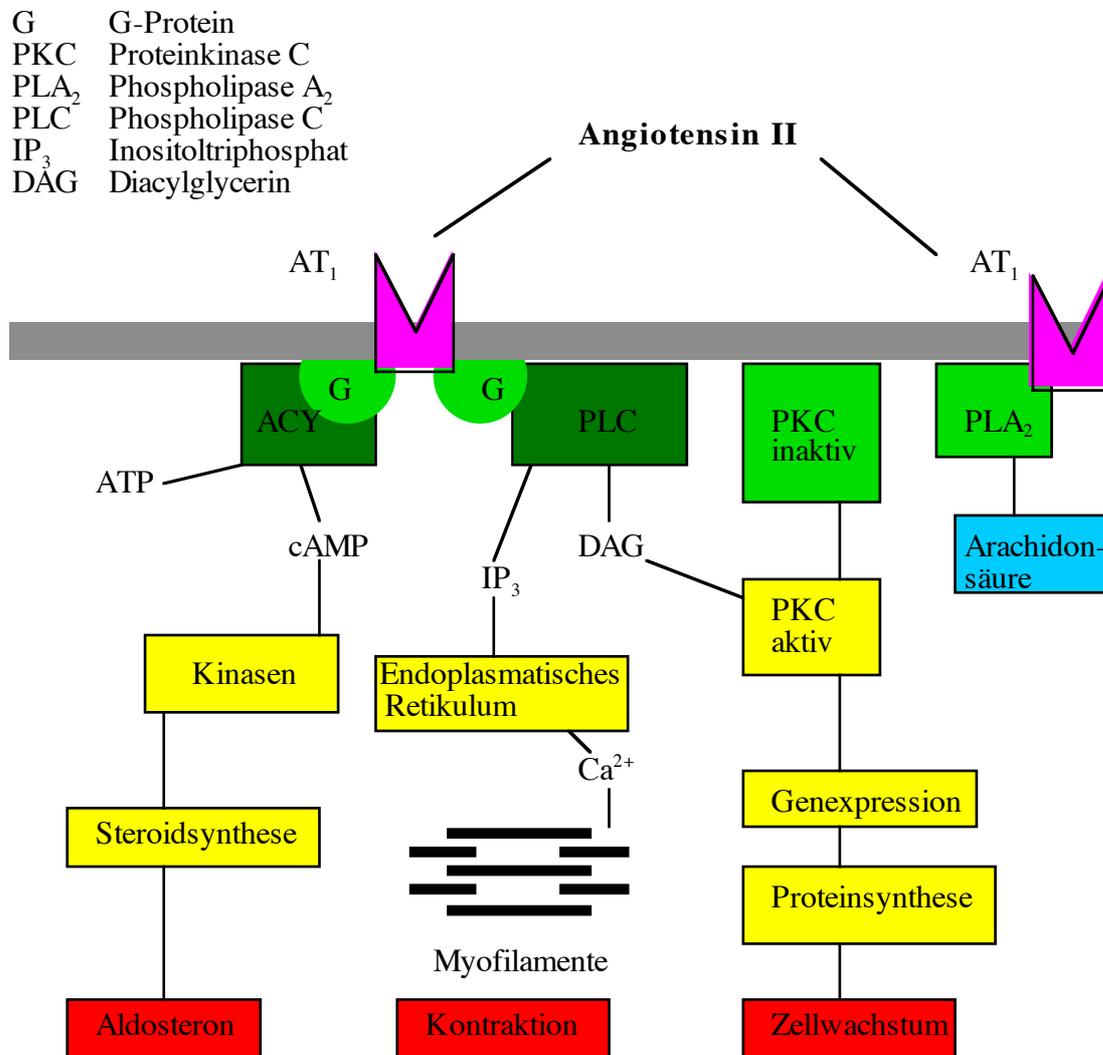
- G-Protein vermittelte Wirkung (Guanin-Nucleotid-bindendes Protein)
- Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration durch Öffnung intrazellulärer Speicher und Öffnung von Ca²⁺-Kanälen.
- Hemmung der Adenylat-Cyclase
- Aktivierung der Angiogenese⁷³
- aktiviert die Phospholipase PLC-γI via Phosphorylierung⁸⁶
- vaskuläre Hypertrophie⁸⁷
- wird durch 1,2-Dithiole und Disulfide denaturiert⁸⁴
- hat mindestens 2 Bindungszustände für Agonisten, aber nur einen für Antagonisten⁸⁴
- aktiviert das Prostaglandinsystem. Diese Wirkung ist aber nicht durch Cyclooxygenasehemmer (Indomethacin) deaktivierbar^{71,88}

AT₂

- ist nicht durch 1,2-Dithiole inaktivierbar, Dithiothreitol verbessert die AT₂-Affinität von AT₂ Agonisten⁸⁴
- kontrolliert das Wachstum in der Embryonalphase
- kontrolliert die Synthese des AT₁ Rezeptoren
- stimuliert Apoptose⁷⁴
- dephosphoryliert MAP Kinasen (Mitogen-aktivierte Protein Kinase)
- aktiviert ebenfalls das Prostaglandinsystem. Diese Wirkung ist aber nicht durch Cyclooxygenasehemmer (Indomethacin) deaktivierbar^{71,88}

Die Stimulation des G-Protein-gekoppelten AT₁-Rezeptoren (Bild 29) bewirkt über die Adenylatcyclase die Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP), aber auch über die Phospholipase C (PLC) die Freisetzung von Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃). Die Reaktionskaskade des cAMP führt zur Aktivierung von Proteinkinasen, die die Mitochondrien zur vermehrten Bildung von Aldosteron anregen.

IP₃ aktiviert im endoplasmatischen Retikulum die Ausschüttung von Ca²⁺, das die Kontraktion der Myofilamente und damit die Kontraktion der glatten Muskulatur bewirkt. Die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch DAG führt zur vermehrten Bildung von mRNA und damit zu Proteinsynthese und Zellwachstum. Darauf basiert die Wachstumshemmung der AT₁-Antagonisten. Nachfolgende Reaktionskaskaden aktivieren das Prostaglandinsystem.⁸¹ Ein weiterer AT₁-gesteuerter Effekt ist die Angiogenese,⁷³ die aber nur über ein kleines Konzentrationsfenster beobachtet wurde. Bei steigenden Konzentrationen, die das zehnfache bis hundertfache des üblichen Plasmawertes an Ang II überschreiten, kommt es zur Apoptose, die durch den AT₂-selektiven Antagonisten PD123,199 verhindert werden kann.⁷⁴ Durch die gleichzeitige Gabe von Kinaseinhibitoren (Vanadat) wird diese Wirkung verstärkt, deshalb wird ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor²¹ auch für den AT₂ postuliert. Die AT₂ vermittelte Wachstumskontrolle geschieht zumindest teilweise durch Apoptose. Da die Expressionsänderung von AT₁ und AT₂ durch steigende Ang II Plasmakonzentrationen vermittelt werden, führt die Gabe von Losartan zu einer Verminderung der Rezeptordichte um 65%.⁸⁷ Die Löschung des AT₁-vermittelten Signales erfolgt durch die Internalisierung des Ang II-AT₁-Komplexes in die Zellen (90% innerhalb von 10 min)⁸⁴ durch Einfurchung der Zellmembran und Vesikelbildung. Nur 25% der Rezeptoren gelangen nach intrazellulärer Freisetzung des Agonisten wieder an die Zelloberfläche, der überwiegende Teil wird abgebaut.



Dieses Schema basiert auf einer Grafik von P. Dominiak und A. Dendorfer

Bild 29⁸¹

Beide Rezeptoren mehrerer Spezies wurden kloniert⁸⁹ und in transgenen Modellen exprimiert. Der AT₁ Rezeptor ist 359 Aminosäuren lang und gehört zur Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren, er weist dementsprechend 7 Transmembranregionen auf.^{85,86} Jede

der 4 extrazellulären Regionen enthält ein Cystein, die zusammen 2 Disulfidbrücken ausbilden, die den Rezeptor stabilisieren.⁸⁴ Die leichte Zugänglichkeit dieser Disulfidbrücken, gepaart mit ihrer hohen Reaktivität gegenüber anderen Thiolen, führt zur Desaktivierung des Rezeptors durch Dithiole und BSA. Die extrazellulären Schleifen werden zusätzlich an 3-Positionen *N*-glycosidiert. Eine Mutationsanalyse der Bindungsstellen schließt die extrazellulären Bereiche als Bindungsstelle aus, obwohl das extrazelluläre His¹⁸³ mit Asp² des Ang II interagiert.⁸⁵ Die Transmembranbindungsstelle wurde durch Austausch von AT₁-Rezeptorsequenzen mit amphibischen AT₁-Abschnitten bestätigt, weil amphibischer AT₁ nur Ang II, aber keine nicht-peptidischen Antagonisten bindet. Insbesondere die nichtpeptidischen Carbonsäuren interagieren dabei mit Lys¹⁹⁹ in der 5ten Transmembranhelix. Derartige Interaktionen können zur Veränderung der Rezeptorstruktur führen, die sich als kompetitiver oder irreversibler Antagonismus äußern. Struktur-Wirkungsanalysen am Ang II dienten zum Nachweis der bindungsessentiellen Seitenfunktionen des Ang II: Arg², Tyr⁴, His⁶ und der wirkungsauslösenden Gruppen: Tyr⁴, Phe⁸. Insbesondere der freien Phenolfunktion des Tyr⁴ kommt hohe Bedeutung zu.⁹⁰ So zeigt das 1-7 Heptapeptid Asp-Arg-Leu-Tyr-Ile-His-Pro-Phe hohe Affinität, aber geringe Wirkung. Im Gegensatz dazu ist das 4-8 Pentapeptid Tyr-Ile-His-Pro-Phe gering affin bei nahezu voller Aktivität.⁸⁵ Die unterschiedlich geladenen Termini des Ang II stabilisieren eine Haarnadelschleife des Peptides.

Der AT₂ ist 363 Aminosäuren⁹¹ lang und weist ebenfalls 7 Transmembranregionen auf, die Sequenzen sind aber nur zu 32% homolog. Die Unterscheidung der Rezeptoren erfolgt durch die unterschiedlichen Affinitäten von Losartan (DuP753, Bild 30) und PD123,177. Losartan bindet mit hoher Affinität an den AT₁, aber nur in geringem Maße an den AT₂.^{78,79} Wesentlich für die klinische Wirksamkeit von AT₁-Antagonisten ist die Ang II-Rezeptor-Expression. Nur ein Drittel aller Angiotensin-II-Rezeptoren im menschlichen Herzen sind AT₁-Rezeptoren; zwei Drittel sind AT₂-Rezeptoren, die vornehmlich im Ventrikel lokalisiert sind.⁸⁷ Noch höhere AT₂-Anteile finden sich in Uterus (100%) und Ovarien (100%).⁸⁴ In der glatten Gewebemuskulatur wird hingegen ausschließlich der AT₁ exprimiert.⁸⁴ Bei terminaler Herzinsuffizienz zeigte sich eine 65%ige Verminderung beider

Ang-II-Rezeptoren. Die Blockade des AT₁ durch z.B. Losartan führt zu gesteigerter Aktivität des AT₂ durch erhöhte Ang II Serum-Konzentration.

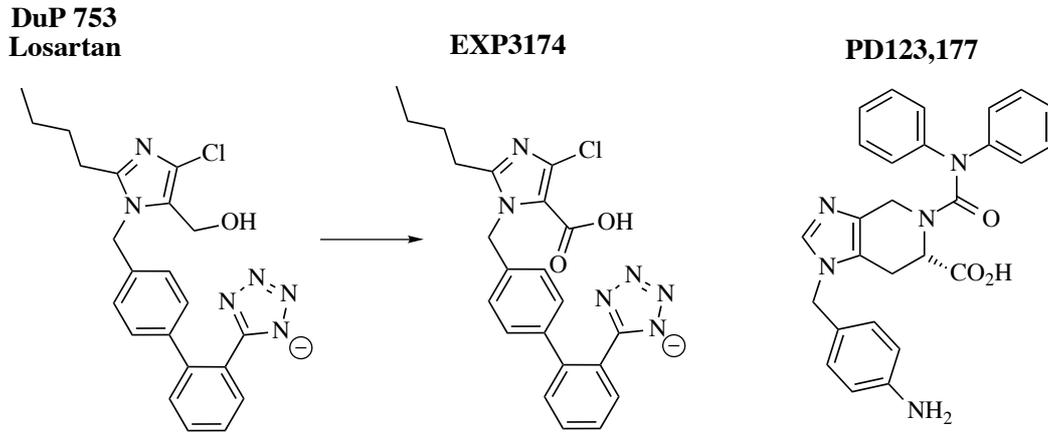


Bild 30

Dies führt unter Anderem zur Verminderung des Zellwachstums von Endothelzellen. “Weiterführende experimentelle Untersuchungen sind notwendig, um die Rolle des AT₂-Rezeptors und seiner Signaltransduktionskaskade im gesunden und insuffizienten humanen Myokard zu klären.”⁷⁰

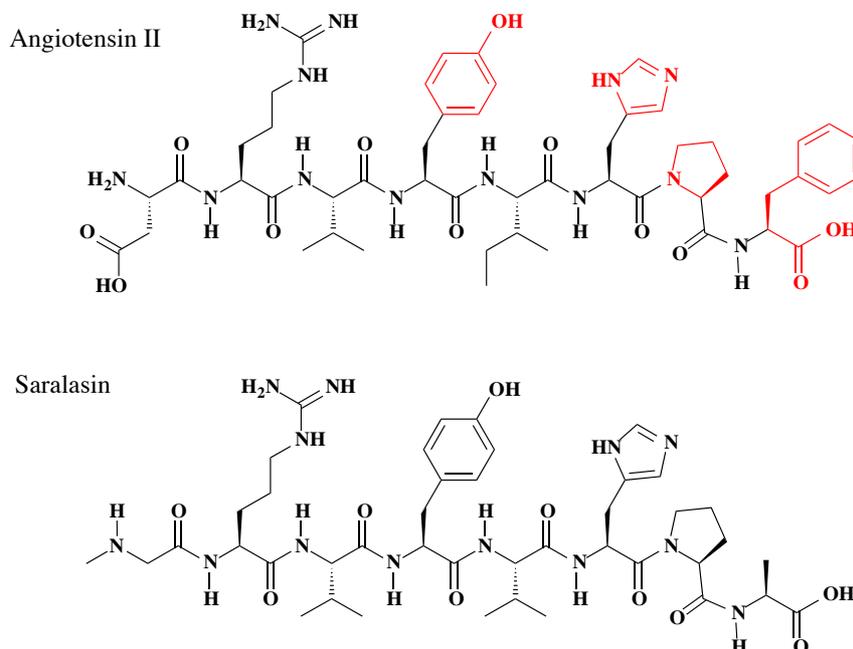
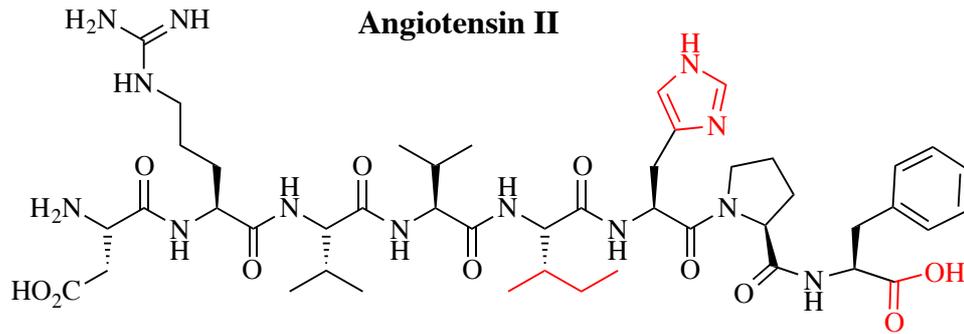


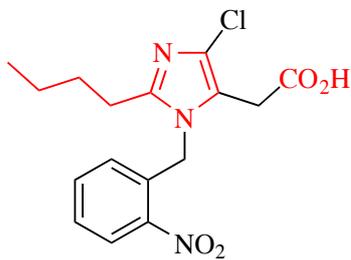
Bild 31

Als erstes antagonistisches Rezeptormimetikum wurde Saralasin entwickelt, das nicht nur hochaffin zum AT₁ ist, sondern auch erhöhte metabolische Stabilität aufweist. Wegen des partiellen Agonismus und dem Fehlen von oraler Verfügbarkeit wurde Saralasin jedoch kein kommerzieller Erfolg (Bild 31).

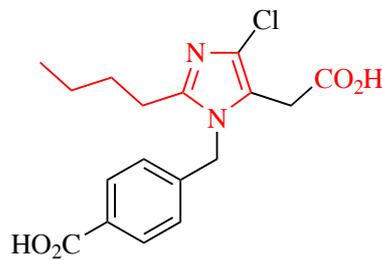
Die Entdeckung der Imidazolessigsäuren als neue Leitstruktur Anfang der 80er Jahre führte 1982 zur Patentierung der Verbindung S8308 durch Takeda. Diese nichtpeptidische Leitstruktur stammte aus einem Substratscreeningprogramm. Die anschließenden Struktur-Wirkungs-Untersuchungen führten innerhalb von 10 Jahren zu der Verbindung DuP 753, die 1995 unter dem Namen Losartan in den amerikanischen Markt eingeführt wurde. Die pharmakophoren Gruppen des Angiotensin II werden durch die Butylseitenkette, den Imidazol-Kern und freie Carbonsäuren imitiert (im Schema rot unterlegt). Die Optimierung des Abstandhalters vom Nitrotoluol bis hin zum Phthalsäureamid führte zu stetig verbesserter Affinität (s. EXP 6155, EXP 6803, EXP 7711).⁸⁸ Obwohl die Affinität mit der Einführung der Biphenyleinheit zurückging, bedeutete dies einen wesentlichen Fortschritt wegen der verbesserten oralen Verfügbarkeit.⁸⁰ Eine weitere 10-fache Verbesserung konnte durch den isosteren Austausch des Carboxylates gegen das lipophilere Tetrazol in DuP 753 erzielt werden. Da Losartan ausschließlich durch Affinität zum AT₁-Rezeptor optimiert wurde, bindet es nur gering an den AT₂-Rezeptor. Weil eine ausgewogenere Rezeptoraffinität jedoch die Langzeitnebenwirkungen verringern könnte, besteht weiterhin Bedarf an solchen AT₁/AT₂-Antagonisten.^{78,92} Die meisten AT₁-Antagonisten sind kompetitive Antagonisten. Die Oxidation von Losartan *in vivo* führt jedoch zur Umwandlung des Alkoholes in eine Carbonsäure. Dieser Metabolit (EXP 3174) ist 10-40x aktiver als Losartan und bindet nicht kompetitiv an den AT₁-Rezeptor!⁹³ Die verlängerte Halbwertszeit (6-9h) dieses Metaboliten läßt Losartan fast als Prodrug erscheinen, das Wirkprofil wird aber durch die Anwesenheit beider Substanzen ausgemacht.



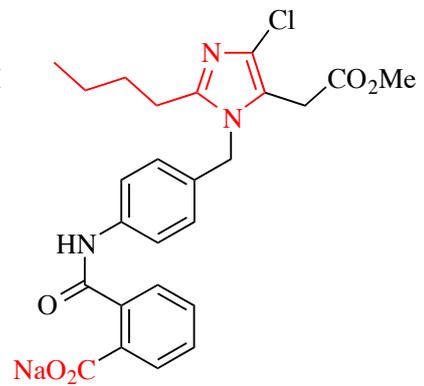
S-8308
IC₅₀ = 15 μM



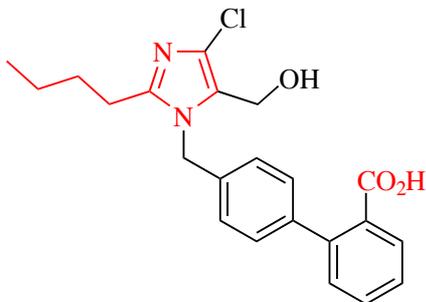
EXP 6155
IC₅₀ = 1,2 μM



EXP 6803
IC₅₀ = 0,12 μM



EXP 7711
IC₅₀ = 0,12 μM



DuP 753
IC₅₀ = 0,019 μM

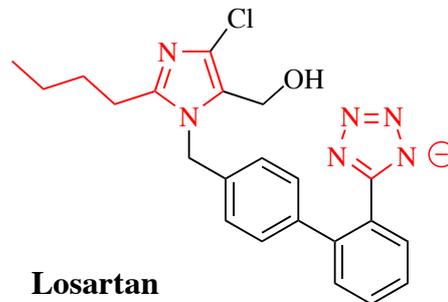
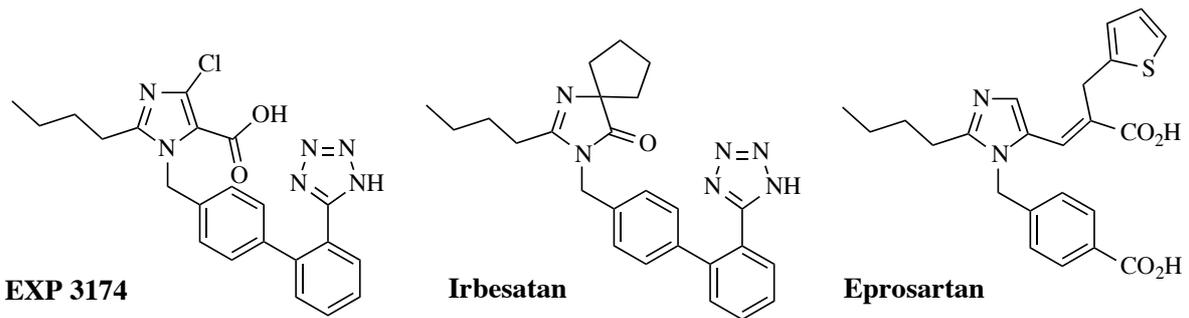


Bild 32⁹²

Weitere eingeführte AT₁ Antagonisten sind Irbesatan und Eprosartan (SKF), beide mit hoher struktureller Ähnlichkeit und deshalb gleicher Rezeptorselektivität.

**Bild 33**

Diese AT₁-Rezeptorantagonisten inhibieren die Vasokonstriktion aller untersuchten Muskelgewebe, sie unterbinden alle bekannten Angiotensin II Effekte:

- Schneller Druckanstieg
- Langsamer Druckanstieg
- CNS-Stimulation - Durst, Vasopressin-Freisetzung und Sympathikus Tonus
- Catecholamin-Freisetzung
- Aldosteronausschüttung
- Ang II-vermittelte Wachstumsprozesse (insb. Niere)

Sie bewirken aber zusätzlich:

- Inhibierung der Neutrophilen-Aggregation durch Losartan⁴⁶
- Inhibierung der Thromboxan induzierten arteriellen Kontraktion durch Losartan-Bindung an den TxA₂ Rezeptor⁷¹

Der Abbau von Losartan erfolgt durch microsomale P450-Oxidation in Leberzellen⁹⁴ und Gluconsäureaddukte.⁹⁵ Die Oxidation des Alkoholes zum Aldehyden EXP 3179 wird gefolgt von der 7x schnelleren⁹⁶ Oxidation [$k_{A1} C_{\text{Losartan}} = 7 \times (k_{A2} \times C_{\text{EXP3179}})$] zu EXP 3174. Ein zusätzlicher Abbau erfolgt durch den Reaktionsweg **B** via Seitenkettenhydroxylierung zu **M2**, **M5** und **P1**. Da die Wirkprofile dieser Metabolite mit Ausnahme von EXP 3174 weitgehend unbekannt sind und Arbeiten von Dr. B. Schieffer an der Medizinischen Hochschule Hannover auf Interaktionen der Sartane mit anderen, nicht Ang II-stimulierten Rezeptoren wie TxA₂ (Thromboxan) hinweisen,⁷⁰ die auch von anderen Gruppen bestätigt wurden,⁷¹ besteht ein hohes Interesse an diesen Oxidationsprodukten.

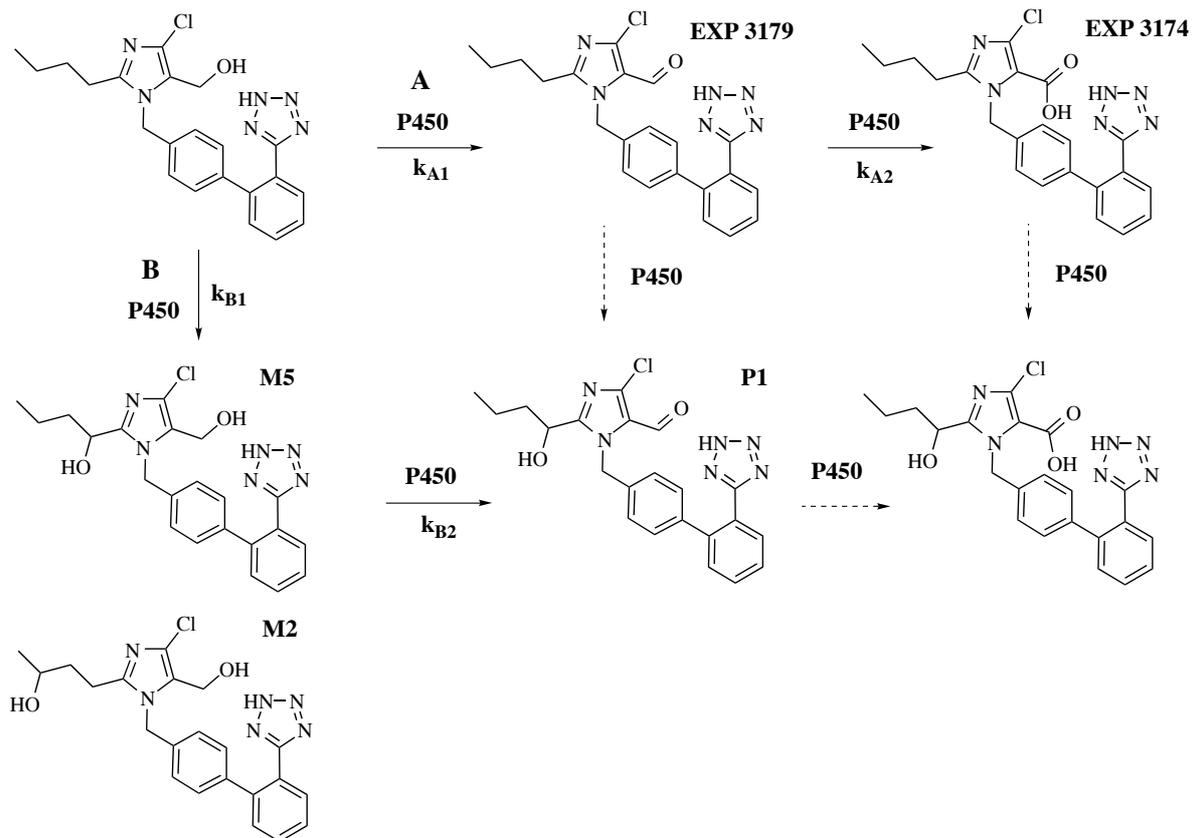


Bild 34 P450 Oxidation von Losartan, Stearns et al.⁷⁰

Dabei stehen Prostaglandin- und Thromboxanwirkungen wie Blutdrucksteigerung, Plättchenaggregation und atherosklerotische Prozesse im Mittelpunkt des Interesses. Daß die Thromboxan-vermittelten Wirkungen nicht auf einer Beeinflussung der Cyclooxygenase basieren, konnte durch gleichzeitige Gabe des Cyclooxygenasehemmers Indomethacin gezeigt werden.⁷¹ Die mögliche Anregung der Wachstumshormonsekretion durch Metaboliten des Losartan ist wegen der Ähnlichkeit zu L-692,49 und L-739,943 (Bild 35) von zusätzlichem Interesse.⁹⁷⁻⁹⁹

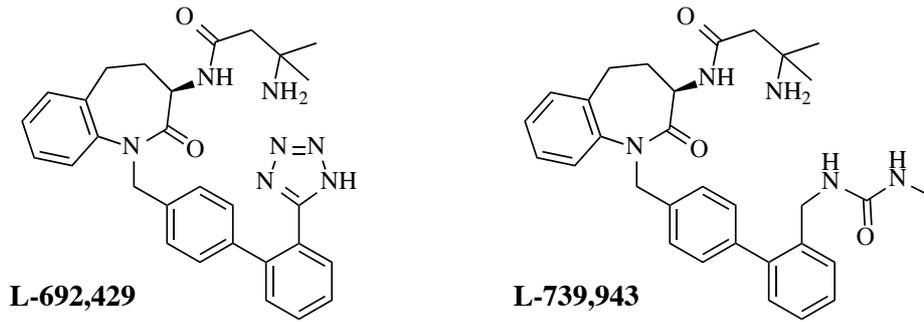
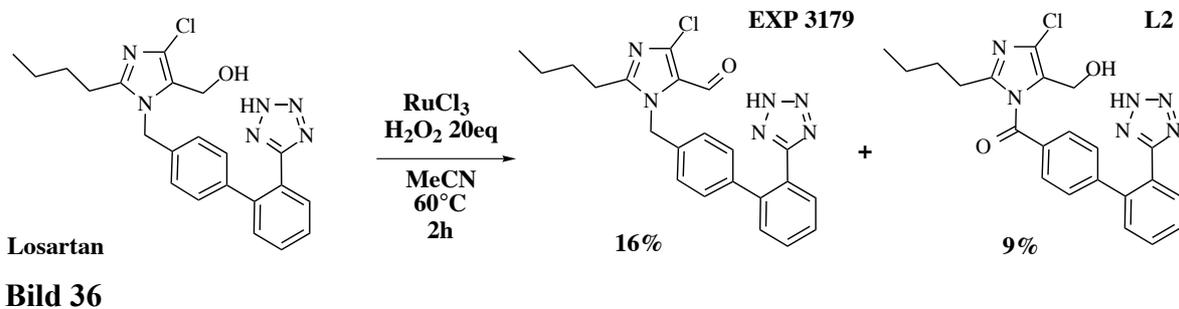


Bild 35 Nichtpeptidische Wachstumsregulatoren⁹⁷

Oxidationen mit P450 Enzymen sind hochempfindlich und benötigen häufig teure Kofaktoren, deshalb wurde die analoge, biomimetische Oxidation von Losartan durch Ru(IV) untersucht. Durch das Erhitzen von Losartan in Gegenwart von Ru(III) und H₂O₂ in Acetonitril werden derartige Produkte erhalten (Bild 36). Zusätzlich zum erwarteten Aldehyden EXP 3179 wurde das neue Benzamid **L2** isoliert. Diese und weitere Oxidationsprodukte befinden sich zur Zeit in der Untersuchung an AT₁- und AT₂-exprimierenden Zelllinien durch Dr. Schieffer und Dr. Hilfiker. Weitere Untersuchungen an nicht Angiotensin II-stimulierten Rezeptoren sind in Vorbereitung.



γ -Schleifen

Die Aufklärungsversuche der rezeptorgebundenen Konformation von Ang II begannen vor über 25 Jahren.¹⁰⁰ Computersimulationen und physikochemische Messungen dienten zur Begründung von Strukturvorschlägen, so formulierten Printz et al.¹⁰¹ 1972 erstmals die Präsenz einer inversen γ -Schleife um das Tyrosyl im Angiotensin II. Diese Vermutung konnte durch die disulfidverbrückten Angiotensin II Analoga von Spear et al. bestätigt werden (Bild 37).¹⁰² Während die Cystin- und Penicillinsäure-verbrückten Peptide trotz guter Affinität an AT-Rezeptoren keine Wirkung im Kaninchen-Aorta Assay zeigten, bindet das homologe Homocystin $c[\text{Hcy}^{3,5}]$ Ang II hoch-affin an den Rezeptor und stimuliert die Vasokonstriktion. Die partiell agonistische Wirkung von $c[\text{Cys}^{3,5}]$ Ang II und $c[\text{Pen}^{3,5}]$ Ang II wurde jedoch nicht näher untersucht. Eine Computersimulation dieser Peptide durch A. Karlén konnte die hohen Wahrscheinlichkeiten von γ -Schleifen aufzeigen.¹⁰³ Eine ECEPP Potentialfeld-Simulation an 16 Ang II Analoga wies jedoch auf 2 dominante Ang II Konformationen hin, bei der Typ I hohe Ähnlichkeit zu den Tyr-Diederwinkeln in $c[\text{Hcy}^{3,5}]$ Ang II aufweist (Tabelle 1), aber keine Ähnlichkeit zu γ -Schleifen.¹⁰⁰

Tabelle 1		
Berechnete Tyrosyl-Diederwinkel für Ang II und Ang II-Mimetika		
nach G. V. Nikiforovich und G. R. Marshall ¹⁰⁰		
Verbindung	Tyr Φ	Tyr Ψ
Ang II Typ I	-81°	-32°
Ang II Typ II	-127°	160°
$c[\text{Hcy}^{3,5}]$ Ang II	-72°	-37°
[D-Tyr ⁴ ,Pro ⁵]Ang II	-123°	163°
inverse γ -Schleife	-65±5°	78±7°

Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, γ -Schleifenmimetika in die 3,5-Position des Angiotensin II zu inkorporieren und die erhaltenen Peptide pharmakologisch zu untersuchen um die Bedeutung dieser Struktur für Angiotensin II aufzuklären.

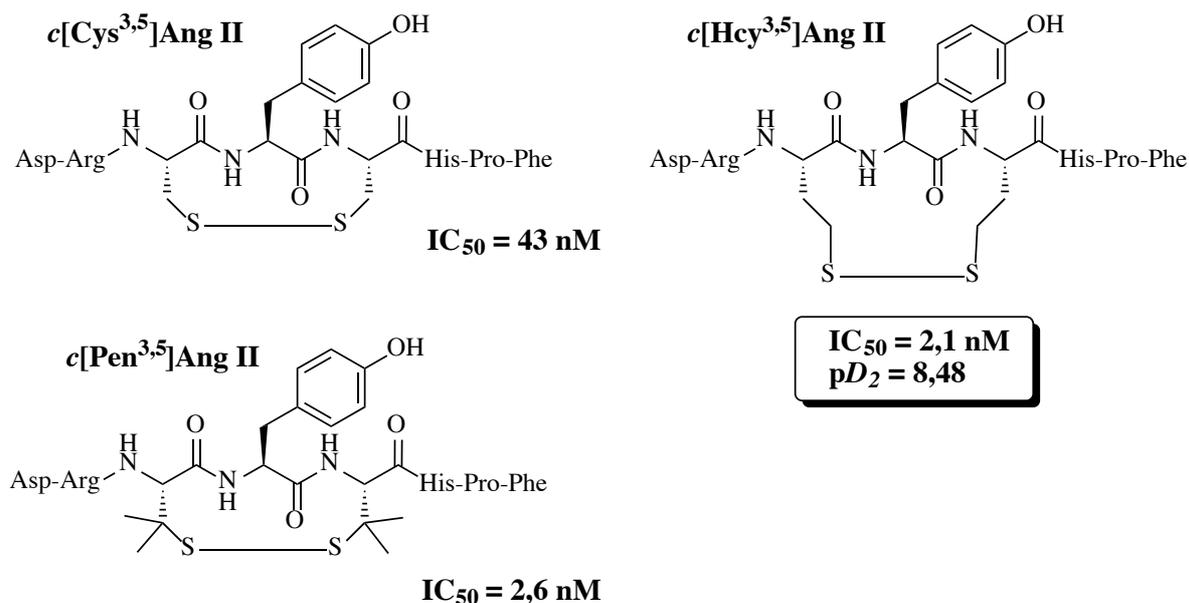


Bild 37

Das 7-Ring Lactam **7** (Bild 20) von Huffman^{49,50} diente dieser Arbeit als erstes Synthesziel. In Analogie zur publizierten Synthese wurde zunächst Anisalkohol **1** (Bild 38) durch eine Birch-Reduktion und Umsetzung mit tert.-Butyldiphenylsilylchlorid in das 1,4-Cyclohexadien **2** überführt.¹⁰³ Die Ozonolyse der elektronenreicheren Doppelbindung und die reduktive Aufarbeitung des Ozonides liefert den Aldehyd **3**, der durch reduktive Aminierung mit NaBH₃CN und Isoleucin-tert.-butylester den Diester **4** ergibt. Die selektive Hydrolyse des Methylesters und anschließende Überführung der freien Carbonsäure in das Acylazid mit Diphenylphosphorylazid bei 0°C resultiert in einer Cyclisierung zu dem ϵ -Lactam **5**. Die Entschützung des Silylethers muß mit dem Tetrabutylammoniumfluorid-Trihydrat erfolgen um die Basizität des Fluorid-Aniones zu reduzieren, weil sonst die Eliminierung

zu dem konjugierten Dien überwiegt. Der freie Alkohol **6** wird durch 2,6 Äquivalente Lithiumdiisopropylamid in das Dianion überführt und mit 4-Benzyloxybenzylbromid alkyliert, wobei unter optimierten Bedingungen die Tyrosylseitenkette in 95% Ausbeute eingeführt wird. Die diastereomeren Alkohole **7** werden in einem Verhältnis 5:3 gebildet und lassen sich nur unter großem Aufwand durch Dickschichtchromatographie trennen. Da die Affinität an das Kieselgel durch den Alkohol geleistet wird, ist die diastereotopie Umgebung dem Solvent zugewandt und wird nur unzureichend differenziert. Bei der chromatographischen Trennung zu einem späteren Synthesepunkt (**9** + **10**) kehrt sich die Situation um. Die Bindung erfolgt durch die Carbonylfunktionen mit ihrer diastereotopen Umgebung, dementsprechend leicht erfolgt dann die Trennung. Überdies können die Derivate parallel verarbeitet werden und ersparen so 3 zusätzliche Syntheseschritte. Deshalb wurde auf eine Trennung der Diastereomeren **7** zunächst verzichtet. Die Umwandlung des Alkoholes zum Amin gelingt durch eine Mitsunobu-Reaktion zum Phthalimid, gefolgt von einer Hydrazinolyse. Anschließend wird das Amin durch Fmoc-Chlorid in Gegenwart von Tetra-butylammoniumfluorid als Phasentransferkatalysator geschützt. Die Hydrolyse des tert.-Butylesters erfolgt in Trifluoressigsäure/Anisol/DCM innerhalb von 60 Minuten quantitativ. Die chromatographische Trennung ergibt die diastereomeren Carbonsäuren in einem Verhältnis von 5:3. Die abgebildeten Isoleucinderivate **9** + **10** lassen sich durch NMR-Spektroskopie differenzieren, eine Konfigurationszuordnung ist aber nicht möglich.

Die beiden Tripeptidmimetika wurden in einer Festphasensynthese zu den Ψ [Lactam^{3,5}]-Angiotensin II Mimetika mittels Fmoc-Technik umgesetzt. Bei der Debenzylierung der Tyrosylfunktion treten jedoch erhebliche Schwierigkeiten auf. Bei Anwendung der von B. Merrifield¹⁰⁴ gerade für das Angiotensin II empfohlenen 2-stufigen Säurebehandlung mit schwacher/starker Säurekombination von TFA und TFMSA werden überwiegend (> 70%) C-benzylierte Umlagerungsprodukte **13** isoliert. Bei der alternativen Entschützung mit HF wird die Isomerisierung der Doppelbindung zu **14** und Addition von HF zu **15** beobachtet.

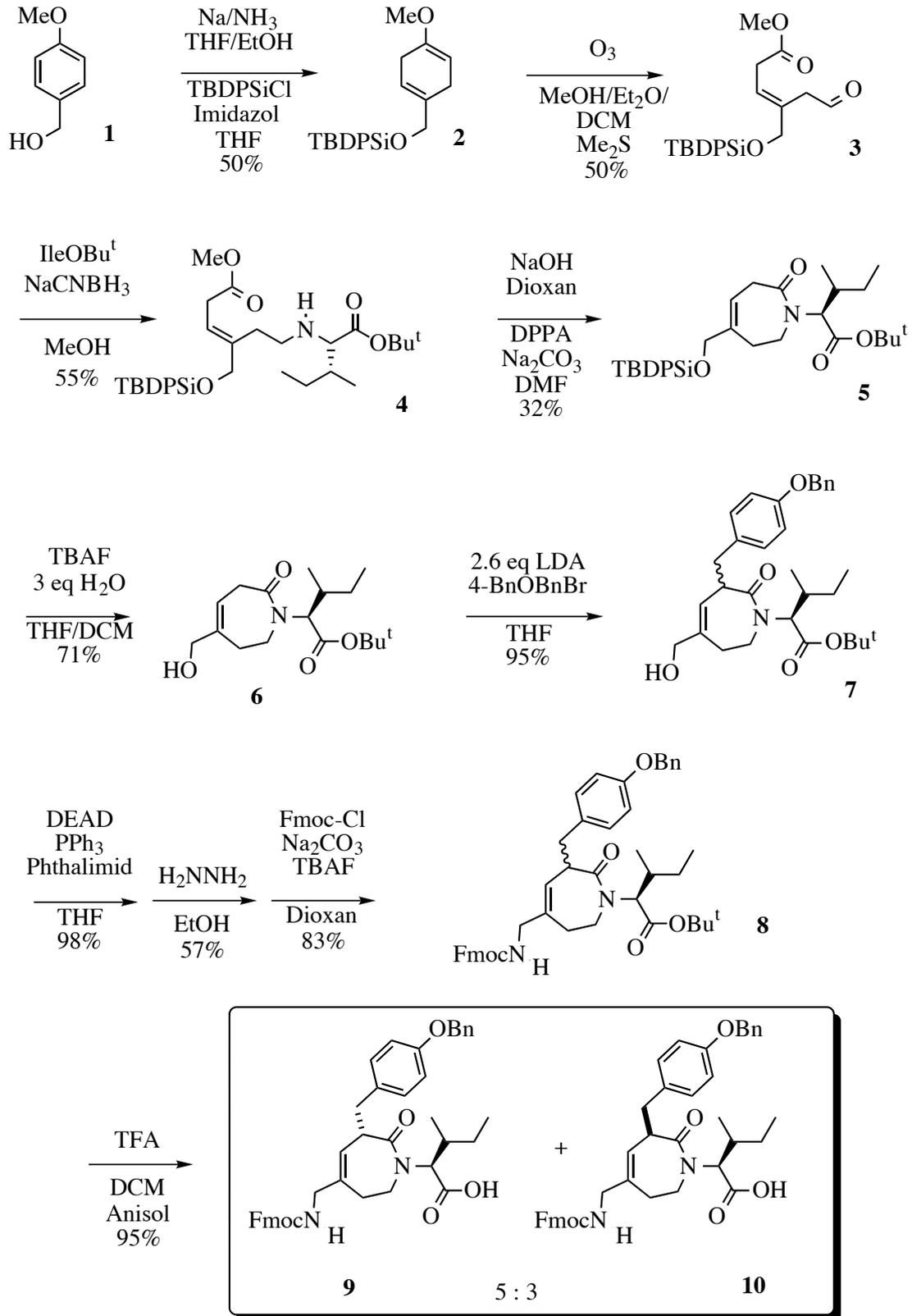


Bild 38 B. Schmidt et al. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 903.

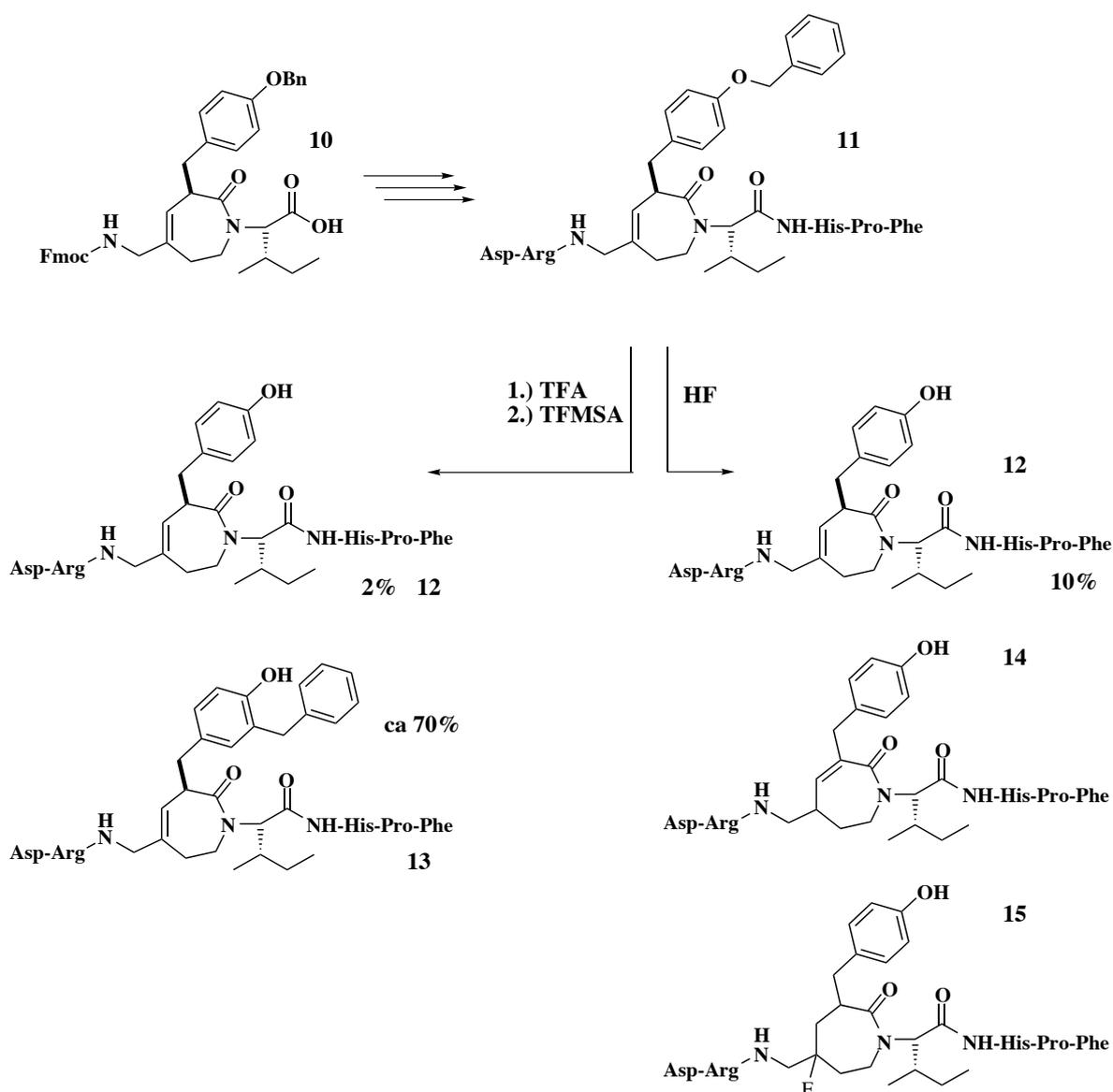


Bild 39 B. Schmidt et al. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 903

Wegen der schlechten Gesamtausbeute und der aufwendigen Reinigung wurde deshalb die Synthese eines stabileren γ -Schleifenmimetikums geplant. Die 7-Ring Lactame offenbaren in molekulardynamischen Berechnungen eine hohe Flexibilität, deshalb sind die Schlußfolgerungen über die Rezeptor-Peptidinteraktion mit einer hohen Ungenauigkeit behaftet. Nunmehr sollte ein rigides Mimetikum entwickelt werden, das auf Grund seiner definierten Konformation auch eindeutige Aussagen zuläßt. Derart konformativ rigide Systeme lassen sich aus Bicyclen oder all-äquatorial substituierten Cyclohexanen erhalten.

Die Zugänglichkeit dieser 1,3,5-all-äquatorialen Cylohexane wurde mit drei verschiedenen Synthesekonzepten untersucht (Bild 40):

- Carbenaddition an Norbornadien + chemoselektive Reduktion
- [4+3]-Cycloaddition, gefolgt von Arylgrignard und oxidativer Öffnung des Bicyclus
- Hydrierung eines 1,3,5-substituierten Aromaten

Die bekannte, Rhodium-katalysierte Addition eines Carbenes aus Diazoessigsäureester¹⁰⁵ an Norbornadien liefert den Tricyclus **3** in 53% Ausbeute bei einem Diastereomerenverhältnis von 3:1. Die regioselektive Öffnung des Cyclopropanes ist der Schlüsselschritt dieser Synthese, der durch heterogene Hydrierung über Palladium auf Kohle quantitativ durchzuführen ist. Da in dieser Sequenz Diastereomere (Bild 41) erhalten werden, wurde auf die Ausarbeitung der Synthese via Dihydroxylierung, Cyclopropylreduktion und abschließende Glykolspaltung verzichtet.

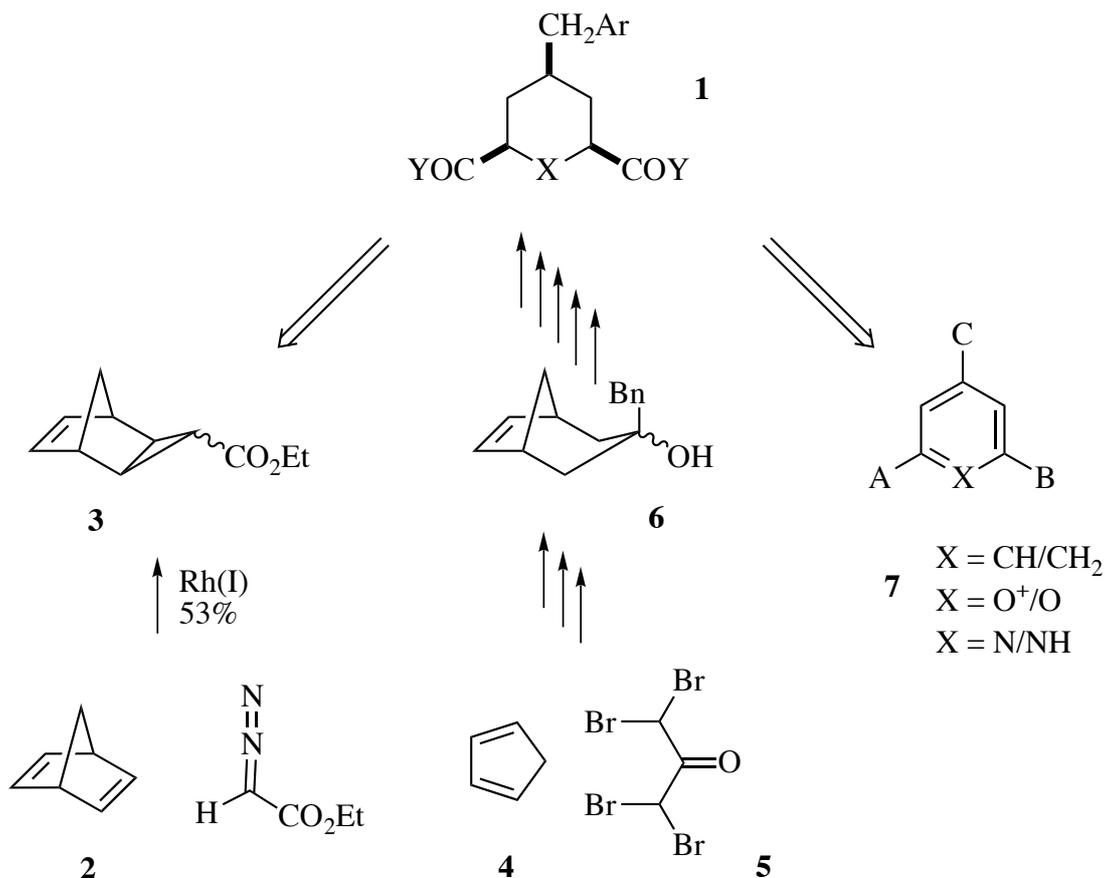


Bild 40 Synthesestrategien

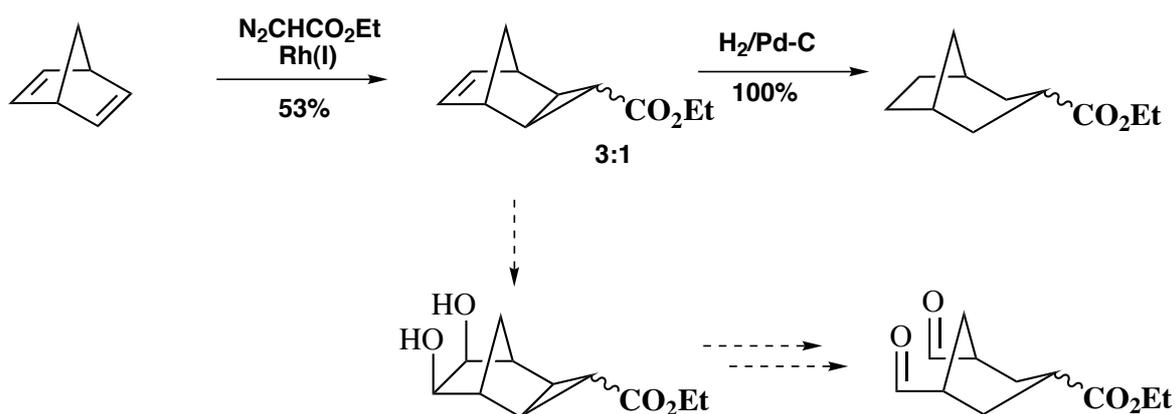


Bild 41

Basierend auf der [4+3]-Cycloaddition¹⁰⁶ ist das Bicyclo[3.2.1]octenon **1** in Gramm-mengen zugänglich (Bild 42). In Anlehnung an zahlreiche Arbeiten von Hoffmann et al. erfolgt die Umsetzung des Ketones mit Benzylgrignard. Die diastereomeren Alkohole **2** werden durch Methansulfonsäureanhydrid und DBU zu den isomeren Dienen **3** eliminiert.

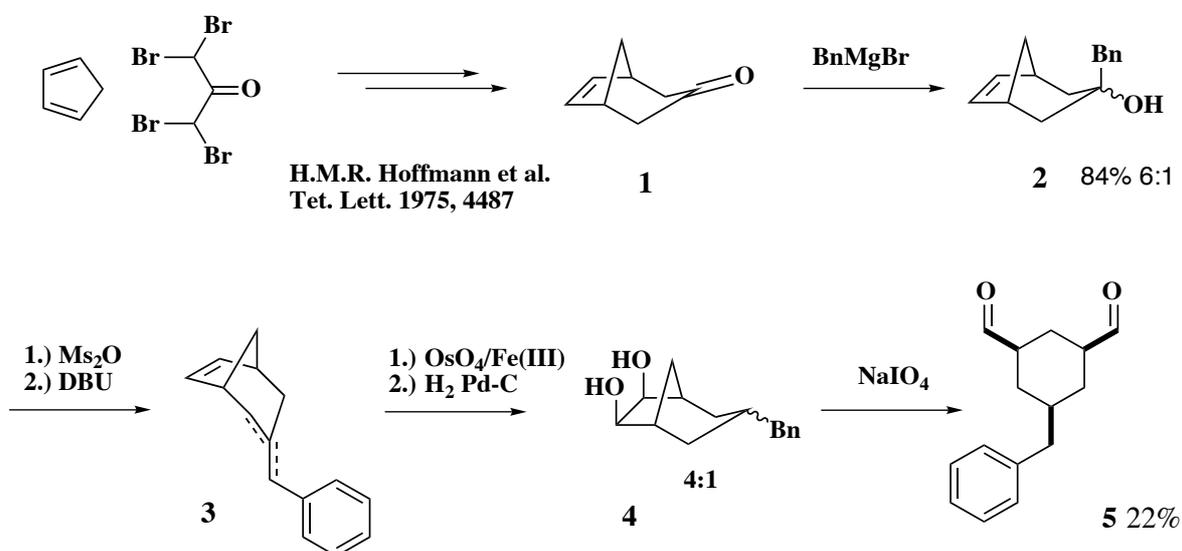
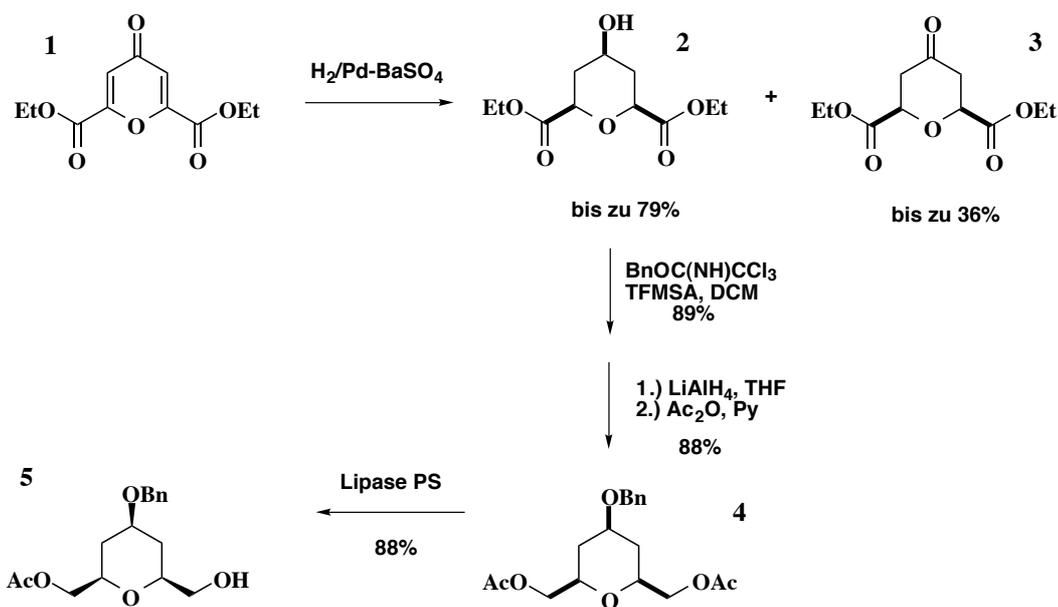


Bild 42

Die selektive Oxidation des gespannteren Olefines erfolgt mit Kaliumpermanganat oder besser mit katalytischen Mengen an Osmiumtetroxid in Gegenwart von $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ zum

vicinalen Diol. Anschließend wird die verbliebene Doppelbindung hydriert zum diastereomeren Bicyclus **4**. Die Glycolatspaltung liefert den Dialdehyden **5** in 22 % Ausbeute über 5 Syntheseschritte. Die basenkatalysierte Epimerisierung führt zu diastereomerenreinem all-äquatorialem Produkt. Diese Synthese liefert zwar das gewünschte System, ist aber mit 8 Reaktionsstufen und vielen chromatographischen Reinigungen sehr arbeitsaufwendig. Deshalb wurde die Hydrierung 1,3,5-substituierter Aromaten untersucht (Bild 43). Ausgehend von Attenburrows¹⁰⁷ Hydrierung des Diethylchelidonates, die in der Ausbeute von 25 auf 79% verbessert wurde, ist das Tetrahydropyran **2** im 100 Gramm-Maßstab leicht zugänglich. Abhängig vom Wasserstoff-Umsatz kann bei vorzeitigem Abbruch auch das Keton **3** in bis zu 36% Ausbeute isoliert werden, hierzu ist allerdings chromatographische Reinigung notwendig. Alle Benzylierungsversuche in Gegenwart starker Basen führten zur Zersetzung des Startmaterials, deshalb wird der Alkohol durch die sauer katalysierte Reaktion mit Benzyltrichloracetimidat¹⁰⁸ geschützt. Der Benzylether wird durch Kristallisation gereinigt.



H.M.R. Hoffmann, T. Lampe, U. Bornscheuer Tet. Asymm. **1996**, 7, 2889

Bild 43

Die anschließende Reduktion zum Diol und Acetylierung des Rohproduktes mit Acetanhydrid liefert das Diacetat **4**, das durch H.M. R. Hoffmann, T. Lampe und U. Bornscheuer¹⁰⁹ zum enantiomerenreinen Alkohol **5** umgewandelt wurde. Mit dieser Synthese ist eine kurze, effiziente Strategie zu entsprechenden all-äquatorial substituierten Cyclohexanen und Tetrahydropyranen entwickelt.

Die gleiche Synthesestrategie diente zur Planung des all-äquatorial substituierten Cyclohexanes **5** (Bild 44). Die saure Veresterung von wohlfeiler Trimesinsäure und nachfolgende ladungskontrollierte Monohydrolyse liefert den Diester **2**, der durch katalytische Reduktion in das Cyclohexan **3** überführt wird. Die Reduktion des Diester liefert ausschließlich das all-äquatoriale Produkt, die analoge Disäure liefert ein Diastereomergemisch, das durch basische Epimerisierung unter Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung zum 1,3-syn-3,5-trans Produkt äquilibriert werden kann.¹¹⁰ Die Aktivierung der Carbonsäure mit Thionylchlorid und anschließende Friedel-Crafts-Arylierung von Anisol führt zum Arylketon **4**, das durch katalytische Desoxygenierung in den gesuchten *meso*-Diester überführt wird. Die ursprüngliche Desymmetrisierung durch Lipasen oder Seebachs TADDOL Reagenz¹¹¹ wurde zu Gunsten einer Diastereomeren-trennung fallengelassen. Die erneute Anwendung einer ladungskontrollierten Hydrolyse, gefolgt von einer reduktiven Aufarbeitung des Carboxylates mit Boran-Dimethylsulfid-Komplex ergibt den racemischen Alkohol **6**, der durch eine Mitsunobu-Gabriel Reaktionssequenz in das Amin überführt wird, das anschließend zum Fmoc-Derivat **8** geschützt wird. Diese Aminosäure wurde durch Festphasensynthese¹¹² in die 3,5-Position der diastereomeren Ang II-Mimetika Cyclohexan A + B (Bild 56) inkorporiert. Die erhaltenen Peptide konnten durch HPLC an RP18-Gel chromatographisch getrennt werden. Eine Zuordnung der absoluten Stereochemie des Cyclohexanes durch NMR-Spektroskopie konnte jedoch nicht getroffen werden.

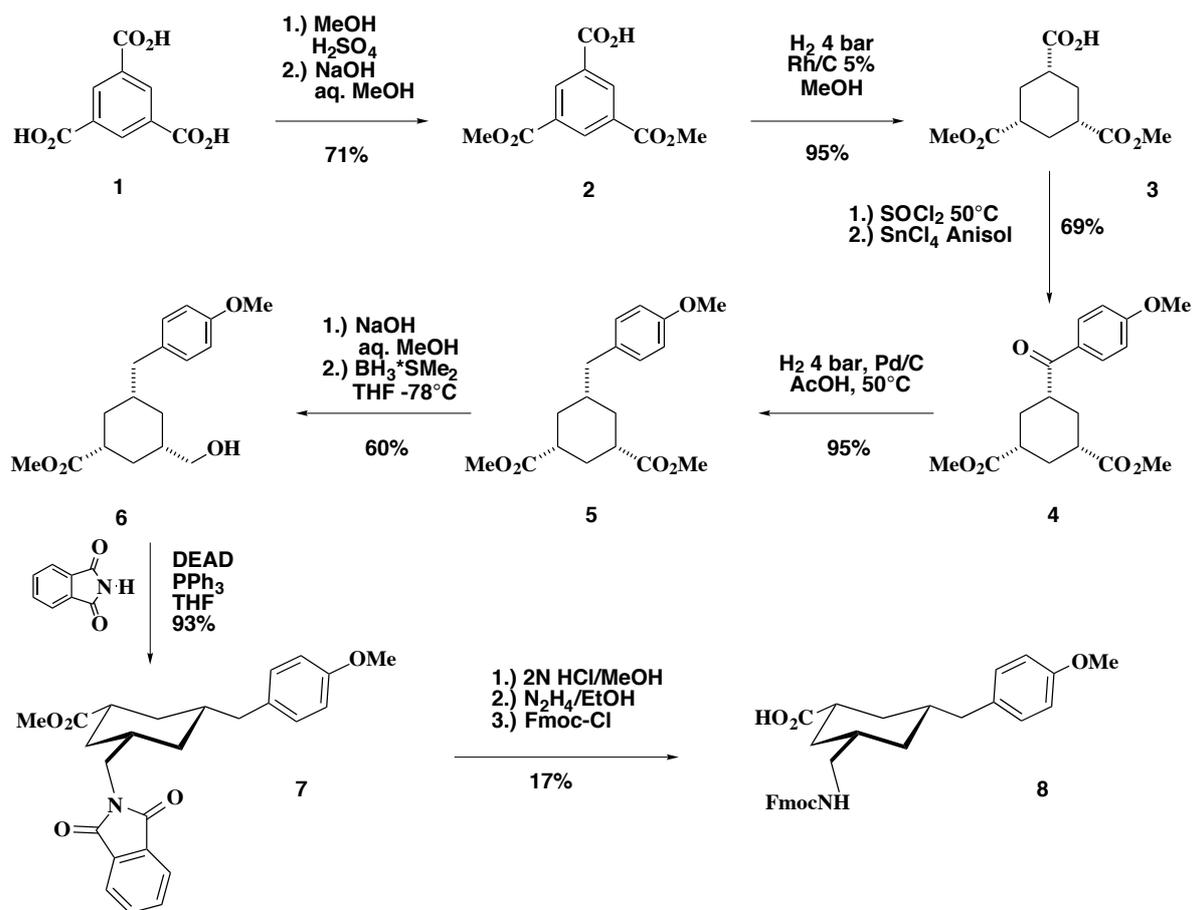


Bild 44

Da sich der Methylether im Peptidmimetikum nicht mehr selektiv spalten läßt und die *O*-Methylierung nicht zu dem erwarteten Antagonisten, sondern zu einem nicht-bindenden Peptid führt, wurde die entsprechende demethylierte Verbindung benötigt. Da sich derartige, flexibel geschützte Phenole nur unselektiv Friedel-Crafts-acylieren lassen, wurde die Synthesestrategie überarbeitet (Bild 45). Die Aktivierung des Trimesinsäuredimethylesters **1** erfolgt nun mit Coreys Mercaptopyridin-Chloroformiat^{113,114} zum Thioester **2**. Derartige Mercaptopyridinester ähneln den Weinreb-Amiden,¹¹⁵⁻¹¹⁸ zeigen aber auf Grund ihrer höheren Reaktivität mit Nucleophilen eine bessere Selektivität im Umsatz mit Grignard Reagenzien.¹¹⁹ Der Umsatz eines **2** analogen Weinreb-Amides mit Arylgrignard liefert Ketone deshalb in Ausbeuten von nur 20-40 %. Die Reaktion des Thioesters **2** mit dem 4-Benzyloxyphenylgrignard ergibt das Arylketon **3** in 65% Ausbeute. Die anschließende katalytische Desoxygenierung führt zum gleichzeitigen Verlust der Schutzgruppe, die aber

wegen der erwarteten Schwierigkeiten in der finalen Entschützung gegen das labilere *p*-Methoxybenzyl ausgetauscht wird.

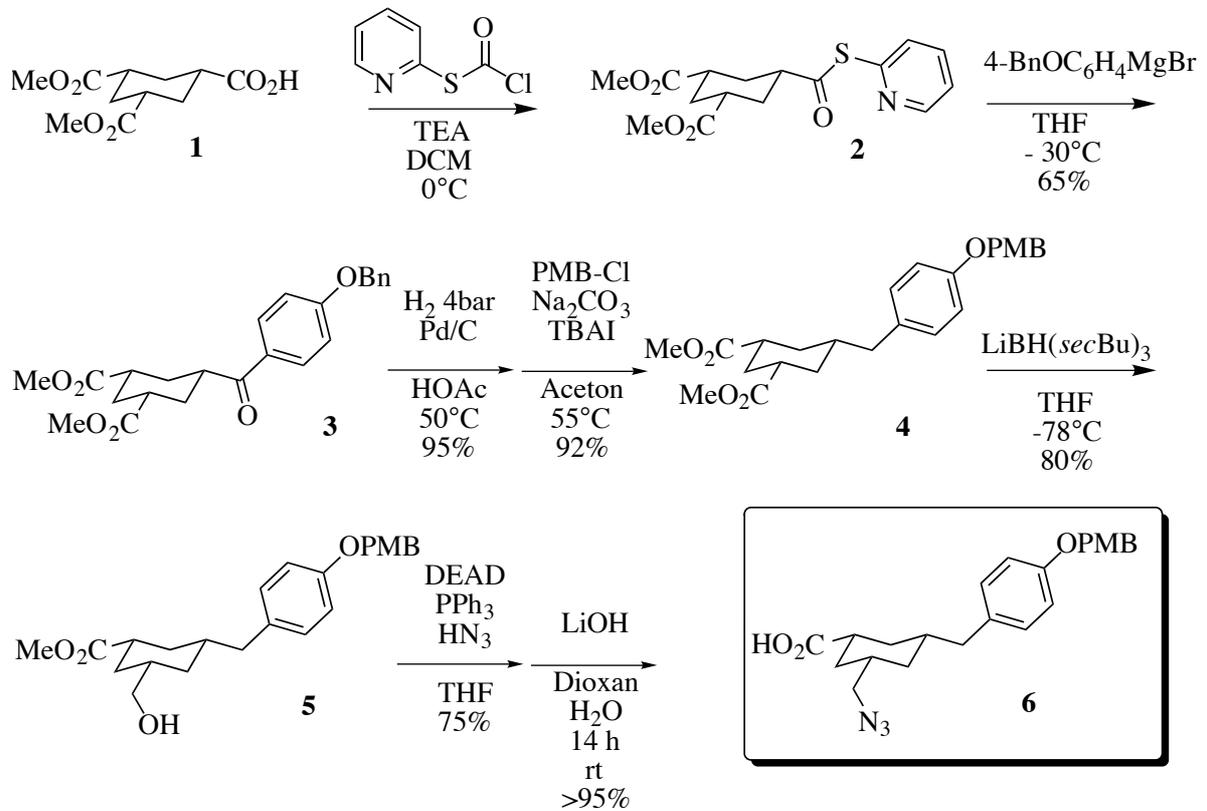


Bild 45

Die selektive Reduktion einer Estergruppe in **4** erfolgt durch L-Selektrid™ bei -78°C . Die anschließende Mitsunobu-Reaktion des Alkoholes **5** mit Azid und Hydrolyse des Methyl-esters ergibt die Azidocarbonsäure **6**, die direkt in die Festphasensynthese eingebracht wird. Nach der Kondensation der Säure durch PyBOP an das harzgebundene Tripeptid His-Pro-Phe erfolgt die Reduktion des Azides **7** zum Amin **8** durch Dithiothreitol in Gegenwart von Diisopropylethylamin (DIEA).

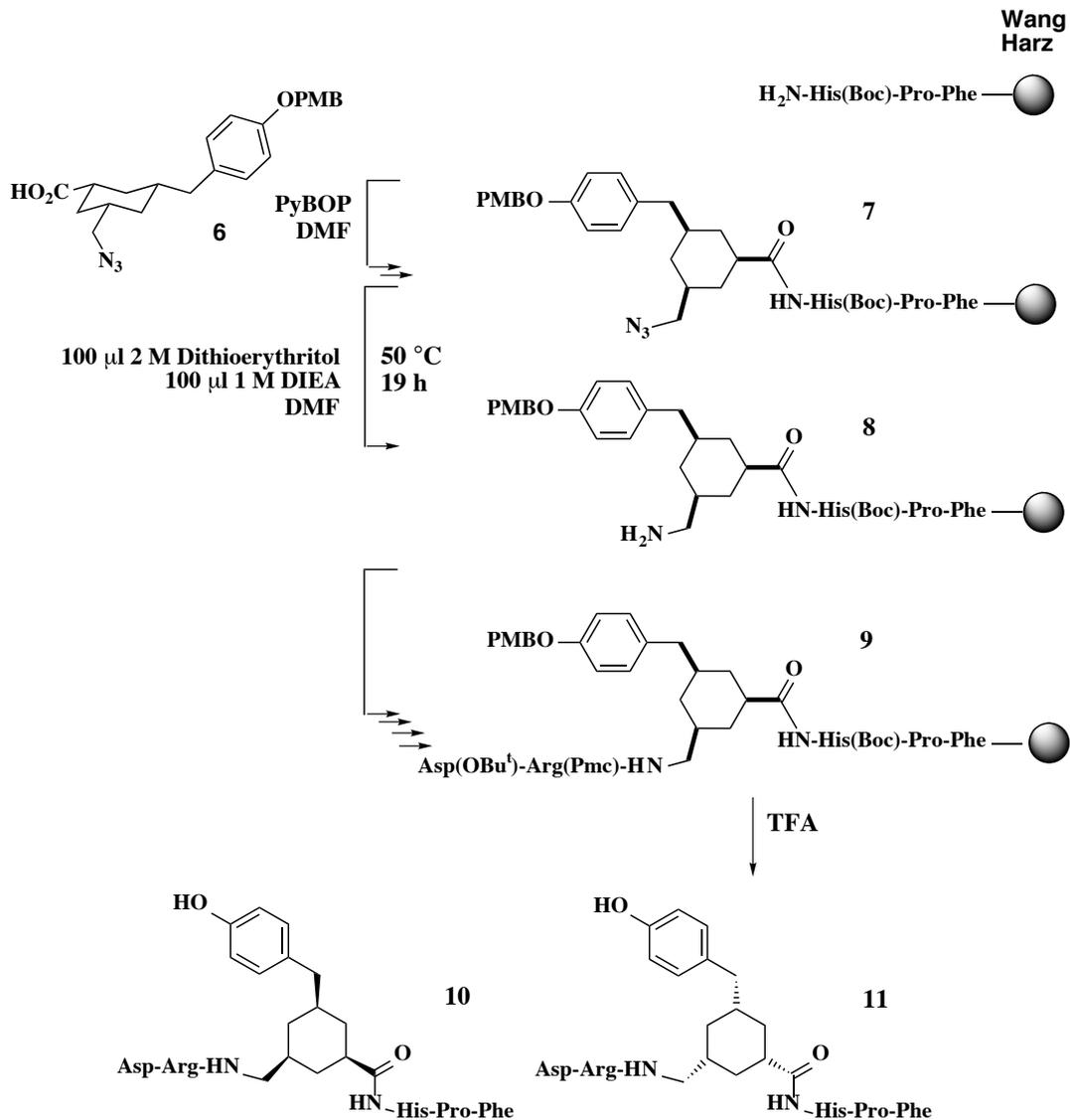


Bild 46 Azidocarbonsäure

Diese direkte Methode, die von Meldal et al. für Festphasensynthesen¹²⁰ entwickelt wurde, schützt das Amin als Azid und verzichtet somit auf 2 unnötige Schutzgruppenschritte. Es folgt die Kupplung/Entschützung-Sequenz mit Fmoc-Arg(Pmc)OH und Fmoc-Asp(tBu)OH zum Ψ -Octapeptid **9**. Abschließend erfolgt die Entschützung durch Trifluoressigsäure und die Trennung der diastereomeren Peptide **10** und **11** (1,6 und 2,6 mg) durch MPLC an RP18 Gelen. Die beiden Peptide werden im Sommer 1998 an AT_1 -Rezeptoren getestet.

Metathese

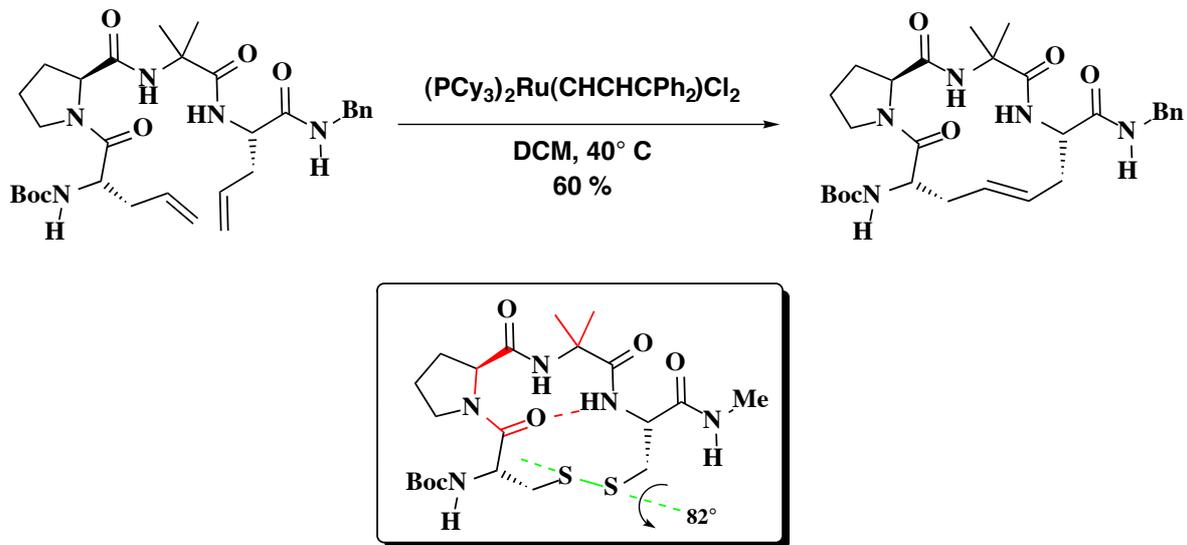


Bild 47 Grubbs Metathese allylierter Peptide

Weil die Ringschlußmetathese¹²¹⁻¹²⁷ (RCM) von entsprechenden 10- oder 11-gliedrigen Ringen¹²¹ noch nicht erfolgreich berichtet wurde, sollte die Metathese 1,3-bisallylierter Peptide durch Ruthenium-Vinylidenkomplexe untersucht werden. Um größere konformative Flexibilität der Peptide im Ringschluß zu ermöglichen, sollten *N*-allylierte Peptide untersucht werden, die auf Grund der Allylierung leichter *cis/trans*-isomerisieren. Überdies entfällt der Bedarf an kostenintensiven C-Allylaminosäuren. Derartige *N*-Rückgratcyclisierungen von Peptiden sind alternativ durch *N*-(ω -Aminoalkyl)aminosäuren zugänglich, die aber eine wesentlich aufwendigere Synthesestrategie und Schutzgruppen benötigen (Bild 48). So wurde sowohl die reduktive Aminierung von Aminosäuren durch *N*-Boc- ω -Aminoaldehyde¹²⁸ als auch die Substitution chiraler α -Bromcarbonsäuren¹²⁹ mit α,ω -Diaminen¹³⁰ berichtet. Geschützte ω -Thioalkylamine wurden in analoger Weise umgesetzt und zu disulfid-verbrückten¹³¹ Peptiden cyclisiert. Die geringen Ausbeuten in der reduktiven Aminierung¹²⁸ sind dabei weniger von Nachteil als die hohen Preise für die *D*-Aminosäuren als Vorläufer der (*R*)- α -Halocarbonsäuren. Da sich die Seitenketten leicht variieren lassen, können Bibliotheken cyclisierter Peptide erstellt werden, um einen großen

konformativen Bereich abzudecken. Dieses Cyclisierungskonzept ist inzwischen als Cycloscan™ geschützt.¹³² Die Schwierigkeiten bei der Kondensation von sekundären Aminen mit Aminosäuren (außer Glycin) führten zur Synthese von *N*-alkylierten Azamethylenisosteren durch sequentielle reduktive Aminierung mit einem α -Aminoaldehyden gefolgt von den Seitenkettenaldehyden.^{16,17}

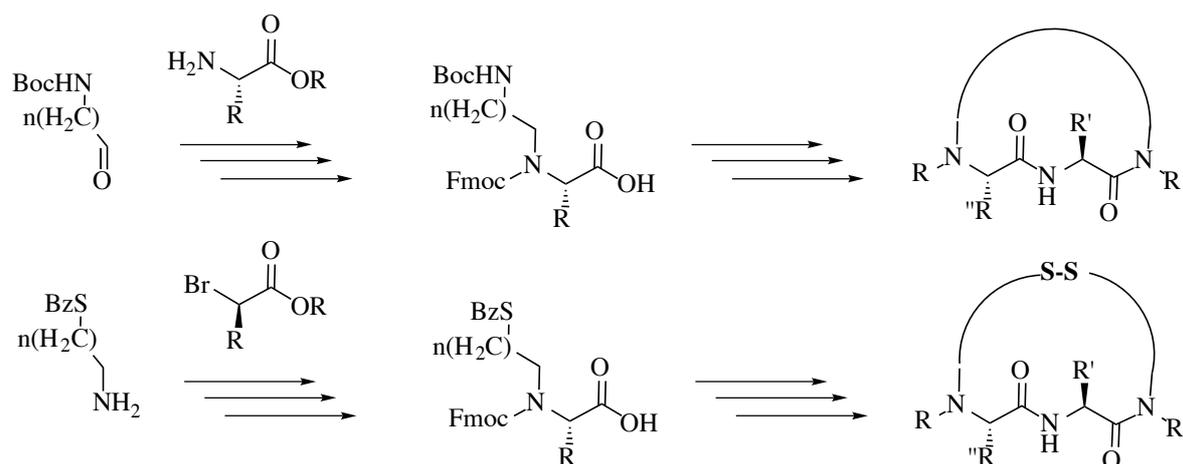


Bild 48 *N*-Allylaminosäuren^{129,131}

Die Synthese derartiger Peptide erfolgt ab einer Kettenlänge von 3 Aminosäuren durch Festphasenpeptidsynthese (SPPS). SPP-Synthesen *N*^l-alkylierter Tripeptide werden erschwert durch die Abspaltung von Diketopiperazinen auf der Stufe des Dipeptides (Bild 51). Die 3,5-*bis*-allylierten Ang II-Analoga lassen sich jedoch ohne Schwierigkeiten durch Fmoc-Technik an Wang-Harzen aufbauen. Als Schutzgruppen der Aminosäureseitenketten wurden typische TFA-labile Schutzgruppen eingesetzt: Asp(^tBu), Tyr(^tBu). Für Arginin und Histidin wurden deaktivierende Schutzgruppen eingesetzt um die Koordination basischer Amine an die Metathesekatalysatoren zu unterbinden: Arg(Pmc), His(Boc) (Bild 49, Bild 55). Das Harz-gebundene Tripeptid His-Pro-Phe wurde durch die Fmoc-Aminosäuren und iterative HBTU-Kupplung aufgebaut, die Fmoc-Schutzgruppen wurden durch 20% (v/v) Piperidinlösung in DMF entfernt und das Harz mit DCM gewaschen. Das *N*-Allylglycin wird durch Modifikation der Zuckerman/Ellman-Peptidsynthesen^{44,133} eingeführt. Hierzu wird der N-Terminus mit 5 eq Chloressigsäureanhydrid in Gegenwart

von 3 eq DIEA acetyliert. Anschließend wird in einer nucleophilen Substitution mit einem großem Überschuß an Allylamin die Allylseitenkette quantitativ eingeführt. Die Festphasensynthese ermöglicht eine einfache Entfernung des Reagenzüberschusses und verhindert die Alkylierung zu 3°-Aminen. Die von Zuckerman empfohlene Verwendung von DMSO ist unnötig, das weniger polare SPPS-Standard-Lösungsmittel DMF liefert vergleichbare Resultate und vermeidet Quelleffekte des Harzes durch den DMSO-bedingten Solvenswechsel. Die Kondensation des Fmoc-Tyr(^tBu)OH erfolgt durch PyBOP, das in einer späteren Sequenz auch durch PyBroP ersetzt wurde, weil bei langsamen Kupplungen mit 2°-Aminen erhöhte Razemisierung der Fmoc-Aminosäure beobachtet wird. Boc-Aminosäuren oder Additive wie HOBt sind für derartige Kupplungen ungeeignet.¹³⁴ Diese kritische Kupplung wurde Plasma-Desorptions-MS (PDMS) oder MALDI kontrolliert. Wegen der vollständigen Reaktion ist ein *N-Capping* mit Acetanhydrid unnötig.

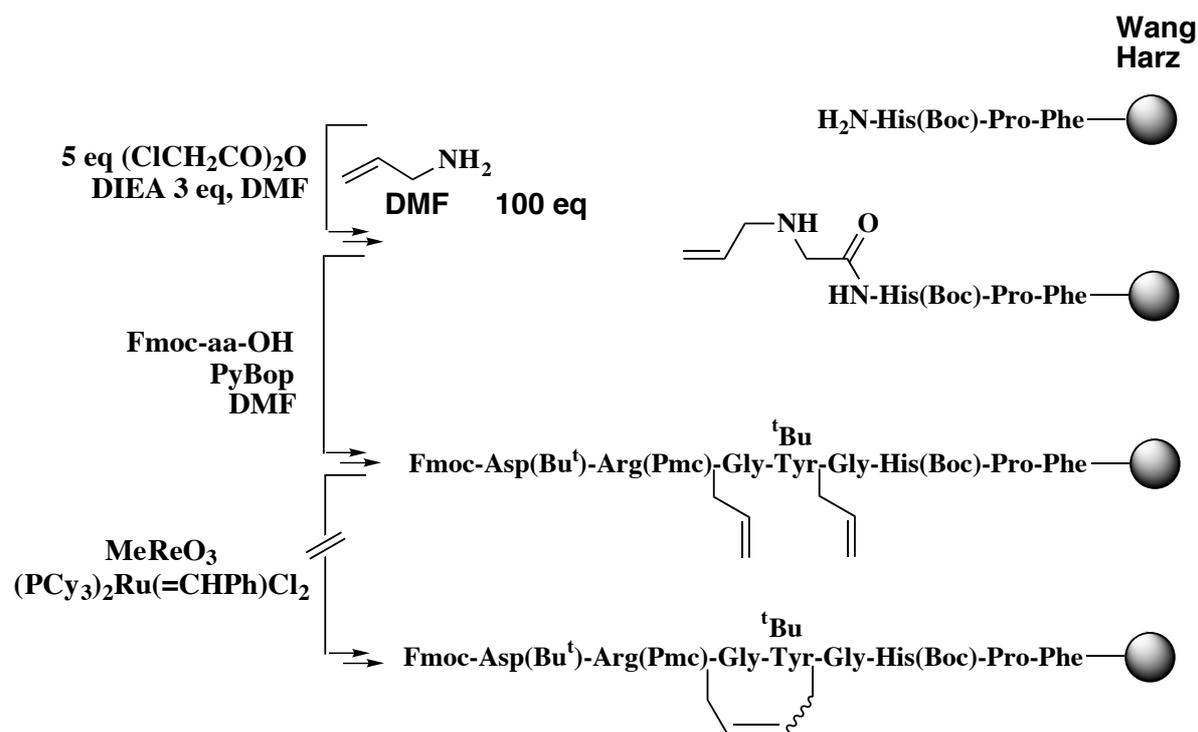


Bild 49 Metathese

Die Wiederholung der Allylglycin-Sequenz und Kupplungen mit Fmoc-Arg(Pmc)OH durch PyBOP und mit Fmoc-Asp(^tBu)OH durch HBTU liefert das geschützte Octapeptid, das in 3

Serien mit Methyltrioxorhenium^{123,125,127,135-137} und 2 Grubbs-Katalysatoren: $(PCy_3)_2Ru(CHCHCPh_2)Cl_2$, $(PCy_3)_2Ru(CHPh)Cl_2$ ^{47,48,121,122,138-141} in DCM oder Toluol unter inerten Bedingungen umgesetzt wurde. In allen Versuchen, auch bei Temperaturen von 70°C (15 h), konnten keine Cyclisierungsprodukte durch PDMS oder MALDI beobachtet werden. Auch der Zusatz von 4-Methyl-1-penten zur Initiation/Termination bei 40°C führte nicht zu gekreuzten Metatheseprodukten. Dies deutet auf Desaktivierung des Katalysatoren durch das harzgebundene Peptid hin. Deshalb sollte die Metathese an Modellpeptiden in homogener Phase untersucht werden. Zu diesem Zwecke wurden *N*-allylierte Tripeptide benötigt, die sich in homogener Phase nur unter großem Reinigungsaufwand durch die Zuckerman-Methode darstellen lassen. Deshalb wurde *N*-Allylglycinethylester durch Acetanhydrid acetyliert und zu dem *N*-terminalen Reagenz *N*-Acetyl-*N*-allylglycin (AAG) hydrolysiert (Bild 50).

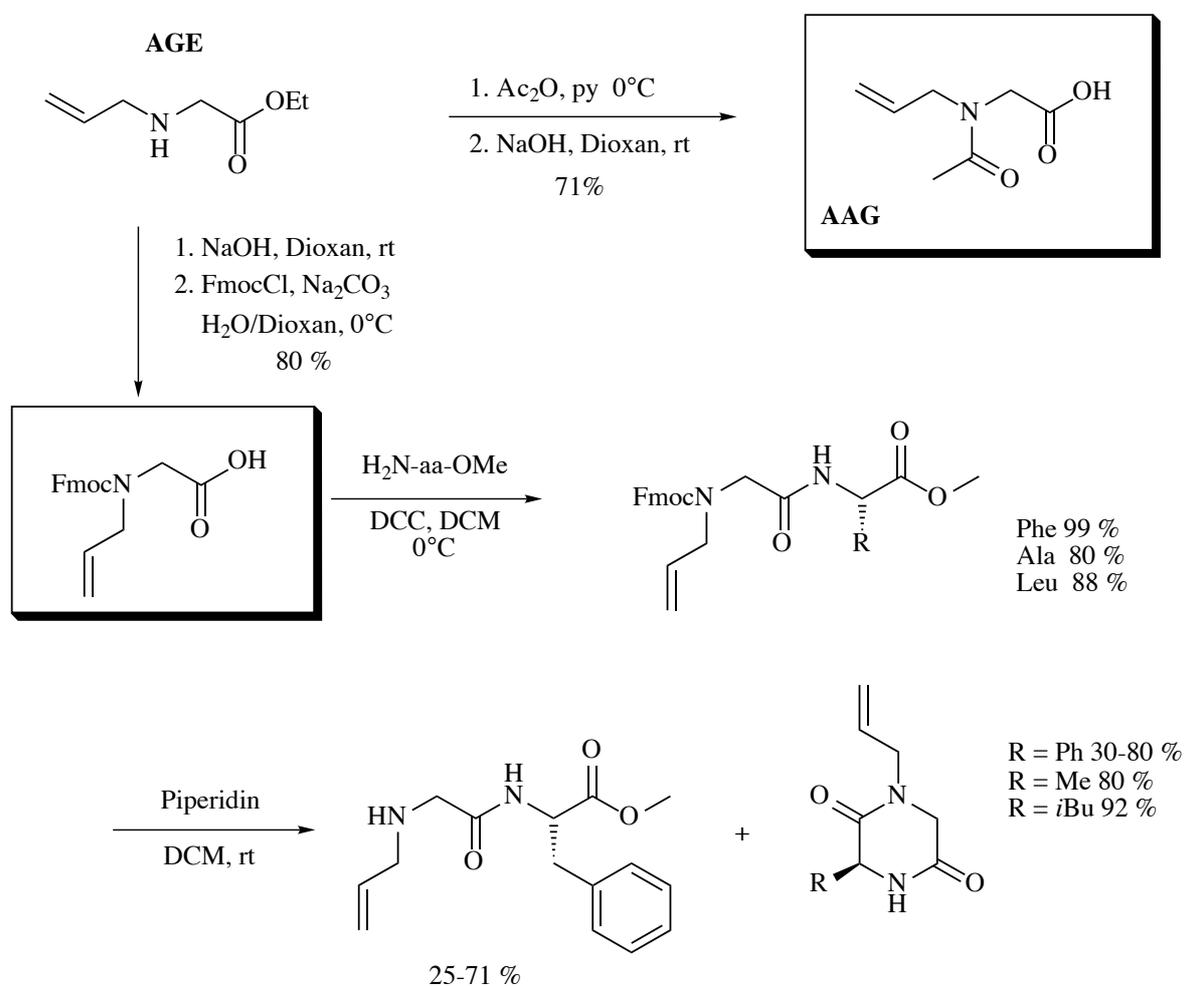


Bild 50

Durch Hydrolyse und nachfolgende Umsetzung mit Fmoc-Chlorid ist das kristalline *N*-Allyl-*N*-Fmoc-glycin zugänglich, das flexibel in der Peptidsynthese eingesetzt werden kann. So liefert die Kondensation mit Aminosäureestern die Fmoc-Dipeptide in 80-98% Ausbeute. Die Entfernung der Fmoc-Gruppe führt jedoch selbst bei 0°C überwiegend zur Cyclisierung zu den Diketopiperazinen. Lediglich das Dipeptid *N*-AllylGly-Phe-OMe ließ sich durch Aufarbeitung bei 0°C rein isolieren und zu 1,3-*bis*-allylierten Tripeptiden umsetzen.

Eine derartige Bildung von Diketopiperazinen tritt häufig bei *N*-methylierten Dipeptidestern auf, sie läßt sich aber durch tert.-Butylester oder eine umgekehrte Syntheserichtung unterdrücken.¹³⁴ So führte auch die Entschützung des von Boc-MeLeu-MeVal-OBn zur Bildung des Diketopiperazines (Bild 51).¹⁴²¹²⁷ In analoger Weise reagierte das Tripeptid Leu-MePhe-Gly-OBn in der versuchten Kondensation mit Boc-Me-Ala.¹⁴³

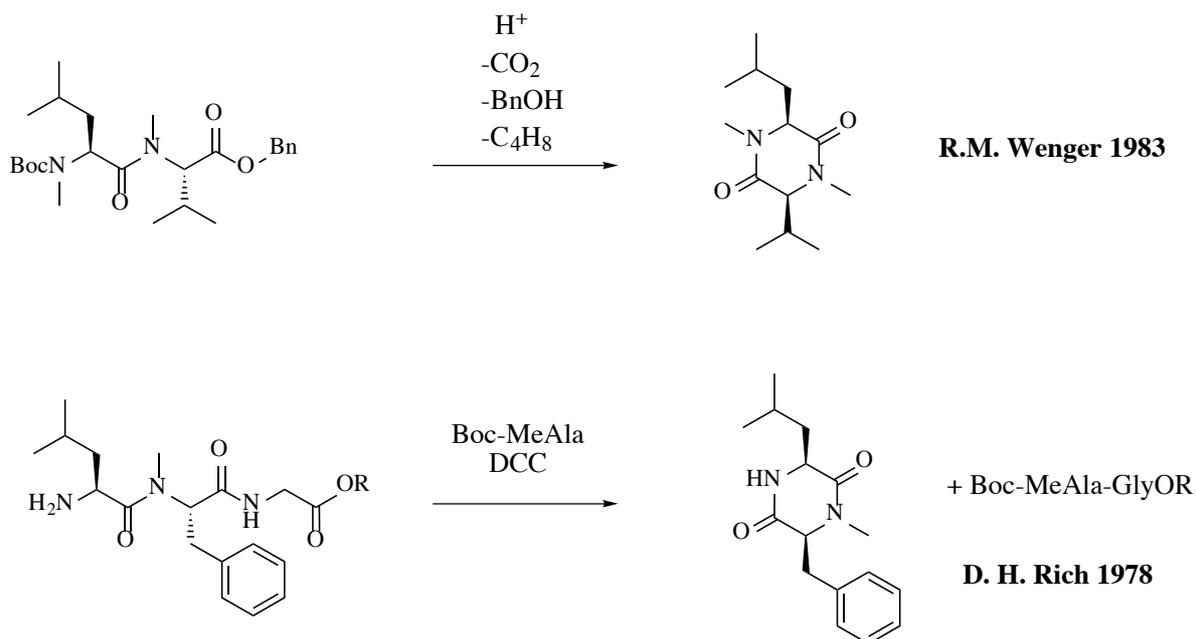


Bild 51 Diketopiperazine

Die besonders reduzierte Aktivität von Boc-geschützten *N*-Alkylaminosäuren wird durch die Bildung stabiler *N*-Carboxyanhydride hervorgerufen. Auch der Zusatz von katalytischen Additiven wie HOBt führt nicht zu besseren Ausbeuten, sondern mit wenigen Ausnahmen zu stabilen HOBt-Estern. Die Ursachen für die wenigen, erfolgreichen Ausnahmen sind unbekannt, deshalb wird von solchen Additiven bei der Kondensation von Acyl-*N*-methylaminosäuren überwiegend abgeraten.¹³⁴

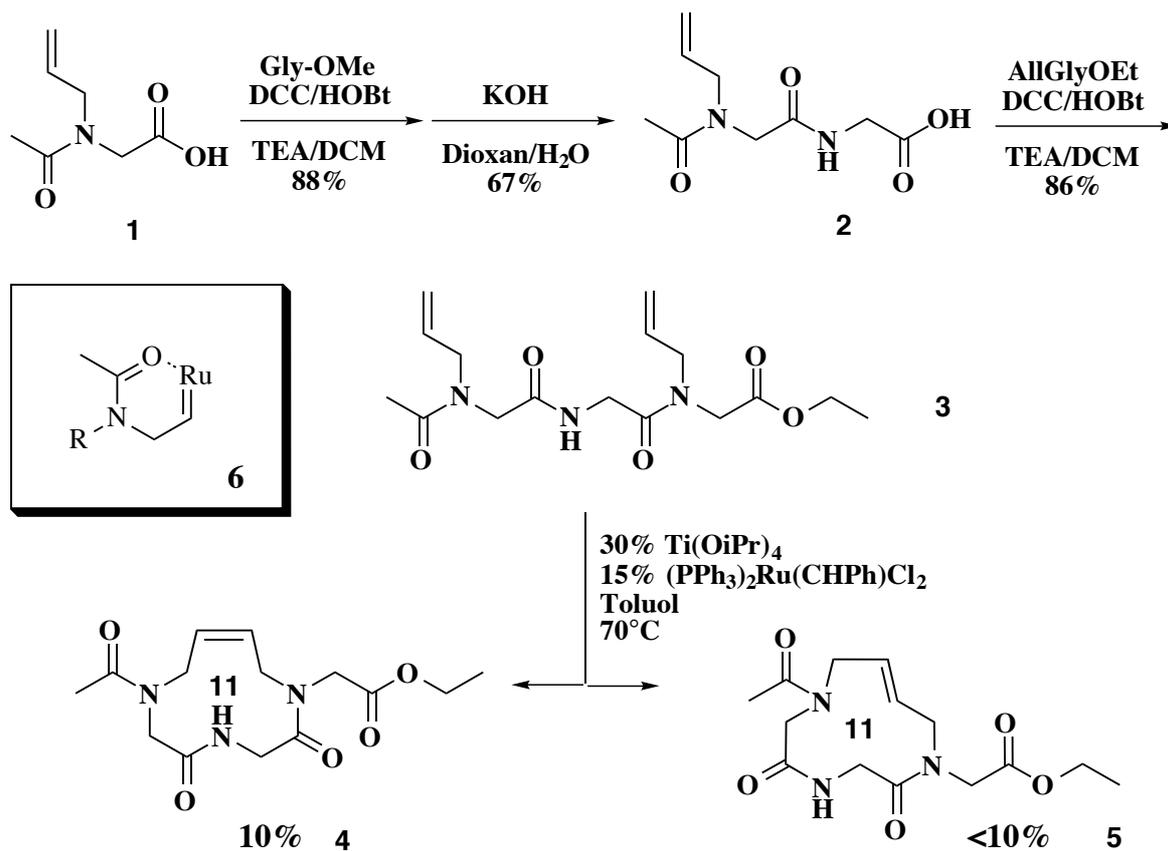


Bild 52 Metathese von 1,3-bisallyliertem Trisglycin

Um die Bildung der Diketopiperazine zu umgehen, wurde das Tripeptid 1,3-*bis-N*-Allyl-Gly-Gly-GlyOEt durch die Umkehrung der üblichen Syntheserichtung dargestellt (Bild 52). Die Kondensation von AAG (1) mit Glycinmethylester ergibt durch anschließende Hydrolyse die Carbonsäure 2, die durch Kondensation mit AGE zum gewünschten Tripeptid reagiert. Die Metatheseversuche mit Grubbs-Katalysatoren waren zunächst erfolglos, trotz eines Katalysatorzusatzes von 30%. Beim Erwärmen der Reaktionsmischungen auf 70°C

reagierte das Peptid innerhalb 32 h langsam ab, allerdings ohne Bildung des gewünschten cyclischen Peptides. Fürstner¹⁴⁴ erklärte das häufige Ausbleiben der Metathese durch stabile 5- oder 6-Ring-Chelate wie **6**. Derartige Komplexe binden das Ruthenium und inhibieren die Metathese. Bei hinreichend hoher Temperatur werden die Aktivierungsenergien zur Freisetzung des aktiven Rutheniumkomplexes erreicht und es kommt zur Oligomerisierung durch Metathese. Durch Zusatz von Titanisopropylat oder Brønstedt-Säuren lassen sich diese Chelate spalten und die Reaktion damit beschleunigen. So liefert der Zusatz von 30% Titanisopropylat auch die ersten Hinweise auf die gewünschte Metathese. GC-MS Analyse der komplexen Produktmischungen und Korrelation mit ¹H NMR Spektren dieser Mischungen geben Hinweise auf die beiden isomeren 11-gliedrigen Ringe **4** und **5** durch entsprechende cis/trans Kopplungskonstanten (11 und 18 Hz) niedermolekularer Fraktionen.

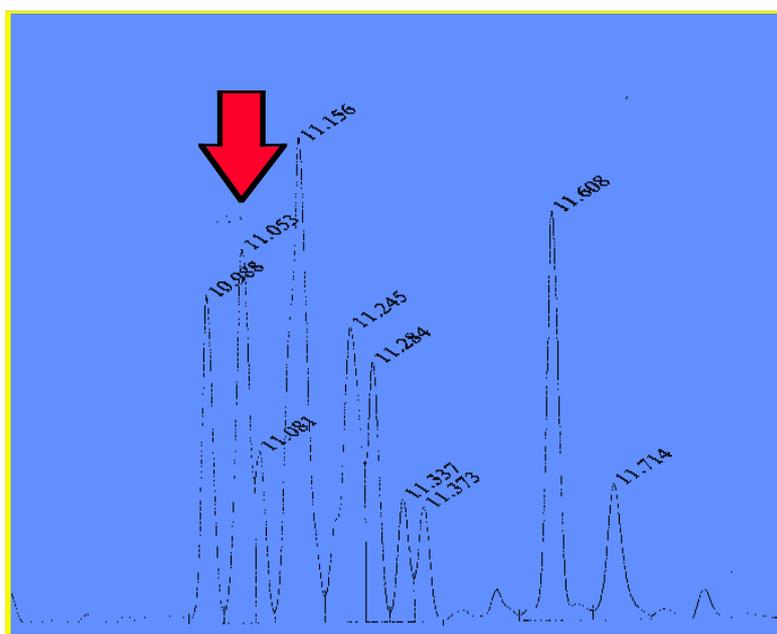


Bild 53 GC der laufenden Reaktion, Startmaterial (**3**) rot markiert

Die erfolgreiche Synthese von 11-gliedrigen Ringen durch RCM ist bislang nicht berichtet worden.¹²¹ Die Versuche von Grubbs et al. an ähnlichen Systemen führten ausschließlich zur Bildung des 6-gliedrigen Ringes, der mit der Standardmethode trotz der Präorganisation

nicht zum 11-gliedrigen Ring geschlossen werden konnte.⁴⁸ Die Metathese ist offensichtlich zum Ringschluß über 1,3-*bis*-Allylabstände ungeeignet.

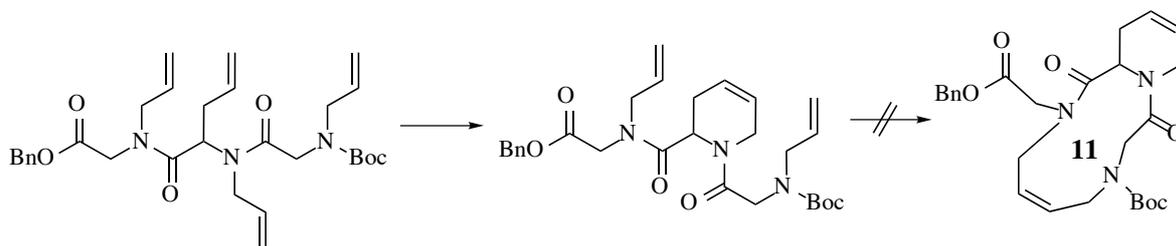


Bild 54 Grubbs Tetraallylpeptide⁴⁸

Rahmenverschobene Disulfide

Die oxidative Cyclisierung von 2 Mercaptoalkylaminosäuren in einem Peptid, z.B. Cystein, Homocystein, Penicillinsäure oder Kombinationen davon, ist eine der häufigsten Methoden den konformativen Raum des Peptides einzuschränken. Ein Nachteil dieser Cyclisierungsmethode für nicht mercaptoalkylierte Peptide ist der Austausch zweier Aminosäuren des nativen Peptides gegen schwefelhaltige Aminosäuren als Cyclisierungsvoraussetzung (Seitenkette-Seitenkette-Cyclisierung: SSC). Ein alternativer Zugang wurde von C. Gilon^{128-132,145} und A. Undén^{16,17} entwickelt, die die Rückgrat-Stickstoffe als Verankerungspunkte ihrer Seitenketten benutzten (Rückgrat-Rückgrat-Cyclisierung: RRC). Hierdurch konnten die natürlichen Seitenketten der untersuchten Peptide beibehalten werden. Diese Methode erfordert jedoch die aufwendige Synthese der entsprechenden Boc-Aminosäuren über vielstufige Synthesen. Fmoc-Derivate benötigen 2 zusätzliche Synthesestufen. Obwohl diese Methode als CycloscanTM namensrechtlich geschützt ist, wird sie durch die langwierigen Synthesen unattraktiv zur schnellen Generierung von cyclisierten Peptidbibliotheken. Um den konformativen Raum von Tripeptiden des Typs: aa-Tyr-aa in neuen Konformationen zu fixieren, die eventuell der biologisch aktiven Konformation entsprechen, wurde deshalb das rahmenverschobene Disulfid (Bild 56) mit pseudo Hcy-Seitenketten synthetisiert. Dieses rahmenverschobene, cyclische Peptid unterscheidet sich

jedoch von den gewöhnlichen disulfid-verbrückten Peptiden durch mehrere, teilweise erwünschte, Aspekte:

1. es hat einen anderen konformativen Raum
2. ihm fehlen die Hcy³ und Hcy⁵ Amid-Wasserstoffe für Wasserstoffbrückenbindungen.
3. es gibt Hinweise auf mögliche Metathese-zugängliche Ringrößen

Das 3,5-bis-N-(2-Mercaptoethyl)glycin [NMGly] substituierte Octapeptid wurde durch Fmoc-Festphasensynthese an einem Wang-Harz erhalten, hierzu wurde das harzgebundene Tripeptid His-Pro-Phe mit α -Bromessigsäure^{44,133} und Diisopropylcarbodiimid (DIC) acetyliert. Um die spätere Entschützung der Mercaptogruppe zu erleichtern, wurde die Cycloscan™-übliche Schutzgruppe Benzyl gegen das säurelabilere Trityl ausgetauscht und deshalb wurde das erhaltene Bromacetamid mit S-Trityl-2-mercaptoethylamin umgesetzt.

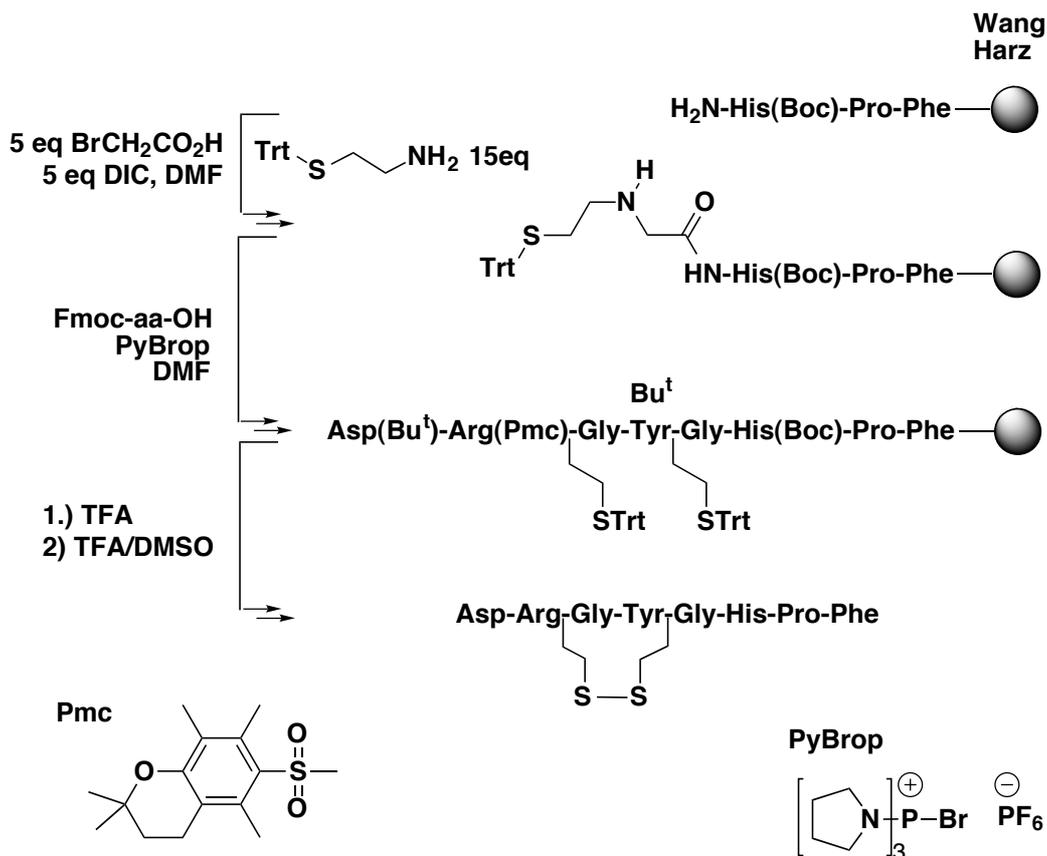


Bild 55 Rahmenverschobene Disulfide

Der Erfolg der Kondensation von Fmoc-Tyrosin mit dem 2°-Amin hängt entscheidend von der Wahl des richtigen Kondensationsreagenzes ab. PyBroP® (Bromtripyrrolidinphosphoniumhexafluorophosphat), das häufig für *N*-Methylaminosäuren^{134,146-148} eingesetzt wird, erwies sich als das Reagenz der Wahl. Nach der Einführung des Tyrosyl und seiner Entschützung folgte die Wiederholung der Bromessigsäure/Mercaptoethylamin-Sequenz. Auch für die Einführung von Fmoc-Arg(Pmc)OH wurde PyBroP® eingesetzt, anschließend folgte die Kondensation von Fmoc-Asp(^tBu)OH durch PyBOP. Nach der Fmoc-Entfernung folgten erste, erfolglose Versuche zur harzgebundenen oxidativen Cyclisierung. Da offensichtlich die notwendige Konformation am Träger nicht eingenommen werden konnte, wurde das Peptid vom Harz durch Trifluoressigsäure/Triethylsilan (TFA/Et₃SiH) gespalten und gleichzeitig von den Schutzgruppen befreit. Das Ether-gefällte, rohe Peptid wurde dann durch 10% TFA in DMSO cyclisiert (25% Ausbeute) und durch HPLC an einer 218TP1010 VYDAC Säule (10 µm, 1 x 25 cm, 0,1% TFA/H₂O, MeCN; Gradient 10-50%) gereinigt. Lyophilisierung ergab ein farbloses, amorphes Pulver. PDMS: 1067,1 (M+H⁺), Aminosäureanalyse: Arg: 1,01, Asp: 1,00, His: 0,99, Pro: 1,09, Tyr: 0,89, Peptid-Gehalt: 72,4 %. Dieses Peptid wurde anschließend in ein AT₁ Assay untersucht (**Tabelle 4**).

Testergebnisse

Während sich γ -Schleifen in Peptiden durch NMR- und IR-spektroskopische Verfahren auf ihre Konfiguration und Konformation untersuchen lassen, ist dies bei den bearbeiteten Schleifenmimetika nicht möglich. Der Austausch der für diese Meßverfahren essentiellen Wasserstoffbrückenbindung schließt diese Strukturnachweise aus. Da für das Angiotensin II keine weiteren Wasserstoffbrückenbindungen beobachtet wurden und die Abstände der Aminosäuren NOE Messungen aussagegelos machen, kann der Strukturbeleg nur durch Rezeptoraffinitäten gegen bekannte γ -Schleifenstrukturen geführt werden. Die in Bild 56 aufgeführten Substanzen wurden in 3 verschiedenen Assays gegen Angiotensin II und DuP 753 (Losartan) als Referenzsubstanzen untersucht.

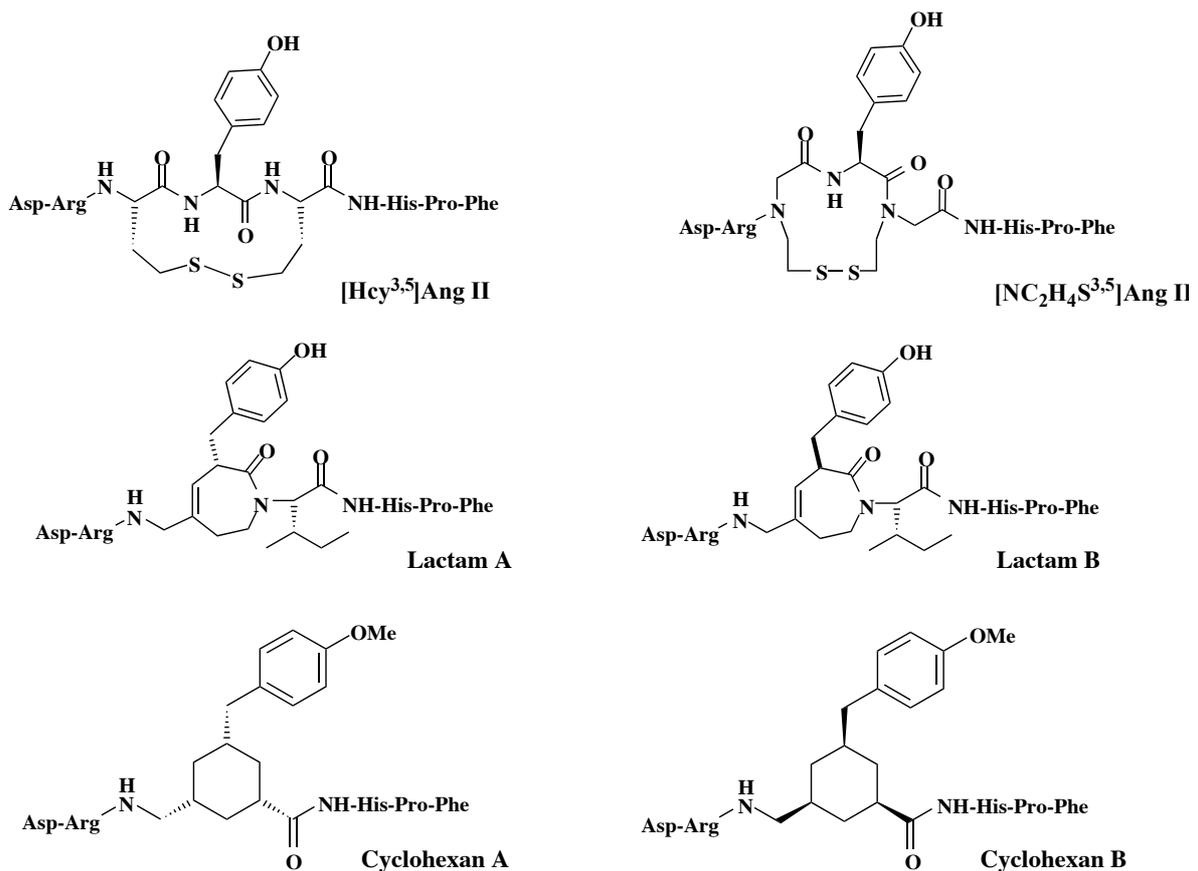


Bild 56

Testergebnisse Kaninchen-Aorta-Assay

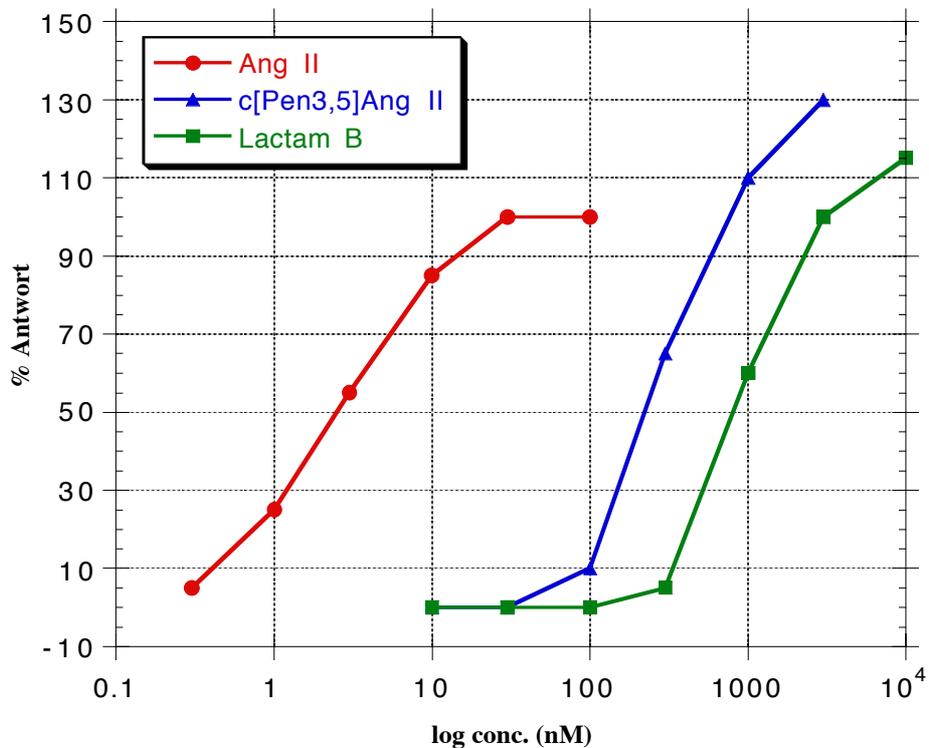


Bild 57 Ergebnisse im Kaninchen Aorta Assay, Normierung auf Ang II-Maximum = 100%

Das Kaninchen Aorta Assay (Bild 58) wird an isolierten Aortastreifen durchgeführt, hierzu wird der Aortastreifen in die Lösungen der Testsubstanz, Angiotensin II und einer Standardlösung gegeben. Gemessen wird die Änderung des Aortadurchmessers. Anschließend erfolgt die Normierung gegen die Ang II Antwort als 100%. Ang II ist 300x aktiver als das Lactam B, dieses bewirkt aber eine höhere maximale Kontraktion (*Efficacy*).

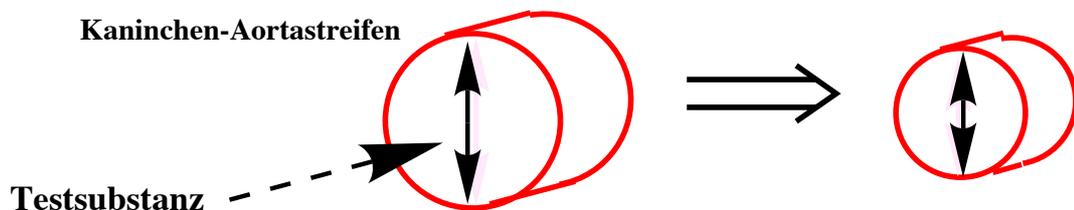


Bild 58

Eine cyclische Fixierung von Ang II-Analoga in der rezeptorgebundenen Konformation, ohne Beteiligung weiterer Faltungsprozesse im Bindungsprozess oder während der Signalauslösung, sollte sich durch deutlich verbesserte Affinität des Mimetikums an den Rezeptor auszeichnen. Dies ist wegen der geringeren Entropieminderung im Bindungsprozess zu erwarten, weil während der Bindung mehrere Torsionsfreiheitsgrade mit Energiebeiträgen von ca 0,8 kcal/mol eingefroren werden.¹⁴⁹ Wenn Angiotensin II also eine γ -Schleife am Rezeptor einnimmt, dann sollte unser Mimetikum wegen der Entropieänderung eine 4-fach verbesserte Affinität zum Rezeptor aufweisen. Aus der geringen Wirkung im Aorta-Assay (Bild 58) und den identischen Bindungsaffinitäten der Lactame im Hypophysen Assay (**Tabelle 2**) sind folgende Schlußfolgerungen möglich:

- Das Lactam-Mimetikum ist kein γ -Schleifenmimetikum.
- Ang II nimmt keine γ -Schleife am Rezeptor ein.

Die Bindung des Lactames A und das Fehlen jeglicher Aktivität im Aorta-Assay lassen zunächst auf einen Antagonisten schließen, Lactam A ist aber bei gleichzeitiger Zugabe von Angiotensin II nicht antagonistisch (s. **Tabelle 2**). Dieses Testergebnis weist auf eine zweite Bindungsstelle am Rezeptor hin, die auch von Griendling und Alexander bei der Verdrängung von ¹²⁵I-Sar¹-Ile⁸-Ang II mit Ang II beobachtet wurde.⁸⁴

Tabelle 2		
Bindungsaffinitäten am Ratten-Hypophyse AT₁ Rezeptor gemessen gegen ¹²⁵I-Ang II		
Substrat	IC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)
Ang II	2,0	2,6
DuP753	1,8	
c[Pen ^{3,5}]Ang II	0,9	217
Lactam A	2,0	
Lactam B	2,9	830

Die Bindungsstudien wurden durchgeführt von Susanna Lindman an Rattenhypophysenzellen. Die Bindungsstudien wurden durchgeführt über 1h bei RT mit [¹²⁵I]Ang II und variablen Peptidmengen. Die Zellen wurden gewaschen, abzentrifugiert und durch einen α -Zähler ausgewertet. Alle Tests wurden im Doppel durchgeführt und durch GraFit 3.0 (SoftWindows) analysiert.

Sie schlußfolgerten, daß es zwei Bindungszustände für Agonisten, aber nur einen für Antagonisten gibt.⁸⁴ Mit Berücksichtigung dieses Befundes sollte es sich bei Lactam A um einen schwachen Agonisten des nicht unmittelbar blutdrucksteigernden Rezeptorzustandes handeln. Die hohe Bindungsaffinität, die in der Verdrängung mit ¹²⁵Ang II bestimmt wurde, kann aber auch auf irreführenden thermodynamischen Gleichgewichten beruhen, die bei der kinetisch kontrollierten Signalauslösung und Signallöschung irrelevant sind.¹⁵⁰

Tabelle 3		
Berechnete Tyrosyl-Diederwinkel für Ang II und Ang II-Mimetika		
nach G. V. Nikiforovich und G. R. Marshall ^{100,151}		
Verbindung	Tyr Φ	Tyr Ψ
Ang II Typ I	-81°	-32°
Ang II Typ II	-127°	160°
<i>c</i> [Hcy ^{3,5}]Ang II	-72°	-37°
[D-Tyr ⁴ ,Pro ⁵]Ang II	-123°	163°
inverse γ -Schleife	-65±5°	78±7°
Cyclohexane	-55°	56°
7-Ring Lactam	-64°	75°

Die Tyrosyl-Aminofunktion ist unbeteiligt an der Rezeptorbindung, denn die α -Methylierung führt zu einem Antagonisten,¹⁵² jedoch mit veränderter Rückgratgeometrie. Andere Agonisten und Antagonisten, denen diese NH-Gruppe fehlt, belegen diese Hypothese.^{149,153,154} So führt die N³-Methylierung von Sar-Arg-Ala-Tyr-Ile-His-Pro-Phe zu Sar-Arg-N(Me)Ala-Tyr-Ile-His-Pro-Phe mit 3-fach verstärkter agonistischer Wirkung.¹⁵⁴ Wesentlich bedeutsamer sind jedoch die Aktivitäten von [Pro⁵]-Ang II (10 %) und dem Superagonisten [Sar¹,Dtc⁵]-Ang II, denen die essentielle NH-Gruppe für eine γ -Schleife um das Tyr⁴ fehlt.¹⁵⁴ Die Ähnlichkeiten der Pharmakoprofile von *c*[Pen^{3,5}]Ang II und dem

Lactam A weisen aber auf eine γ -Schleife bei der Aktivierung des Rezeptors hin. Der Vergleich der berechneten Tyrosyl-Diederwinkel in Tabelle 3 weist aber auf die Abweichung der aktiven Substanzen von einer γ -Schleife hin. So ist für die Bindung an den Rezeptor eine offene Schleifenstruktur wahrscheinlich, wie sie von Nikiforovich postuliert wurde.^{100,151} In einer gegenseitigen Beeinflussung ändern sich die Konformationen von Substrat und Rezeptor (*double induced fit*).

Tabelle 4	
Bindungsaffinitäten am transgenen Ratten-AT₁ Rezeptor exprimiert in Chin.-Hamster Ovarienzellen, gemessen gegen ¹²⁵I-Ang II	
Substrat	IC ₅₀ (nM) AT ₁
Ang II	2,6
DuP753	26,1
c[hCys ^{3,5}]Ang II	0,17
Cyclohexan A	1000
Cyclohexan B	1000
N,N-Disulfid	1000

Die Bindungsstudien wurden durchgeführt von Susanna Lindman an transgenen *Chinese Hamster Ovary Cells* (CHO), die den AT₁-Rezeptor exprimieren. Die Zellen wurden in Flaschen auf RPMI Medium mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) gezogen. Die Zellen wurden 1x mit *Hank's Balanced Salt* Lösung (HBSS) gewaschen, zentrifugiert, in Pufferlösung resuspendiert und in *96 well plates* überführt. Die Bindungsstudien wurden durchgeführt über 1h bei RT mit [¹²⁵I]Ang II und variablen Peptidmengen in HBSS. Die Zellen wurden gewaschen, abzentrifugiert und durch einen α -Zähler ausgewertet. Alle Tests wurden im Doppel durchgeführt und durch GraFit 3.0 (SoftWindows) analysiert.

Die schlechten Bindungsaffinitäten der beiden Cyclohexane A und B (**Tabelle 4**) sind nicht auf die *O*-Methylierung des Tyrosyls, die zu Ang II-Antagonisten führt, sondern auf unzureichende Geometrie des Mimetikums zurückzuführen. MM2-Berechnungen in ChemDraw 3D⁺ (Bild 59) führten zur abgebildeten Struktur des energieminierten Cyclohexanes (blau). Die Überlagerung mit einer idealen γ -Schleife (rot) des Tripeptides N-Ac-Gly-Tyr-Gly-NHMe anhand der gelb indizierten Positionen führt zu einer guten geometrischen Entsprechung für den N-terminalen Bereich. Die Carbonylfunktion der *i*+2

Aminosäure ist jedoch fehlorientiert. Die C₁-Verlängerung des C-Terminus sollte zu einer verbesserten Struktur und damit einem besseren γ -Schleifenmimetikum führen.

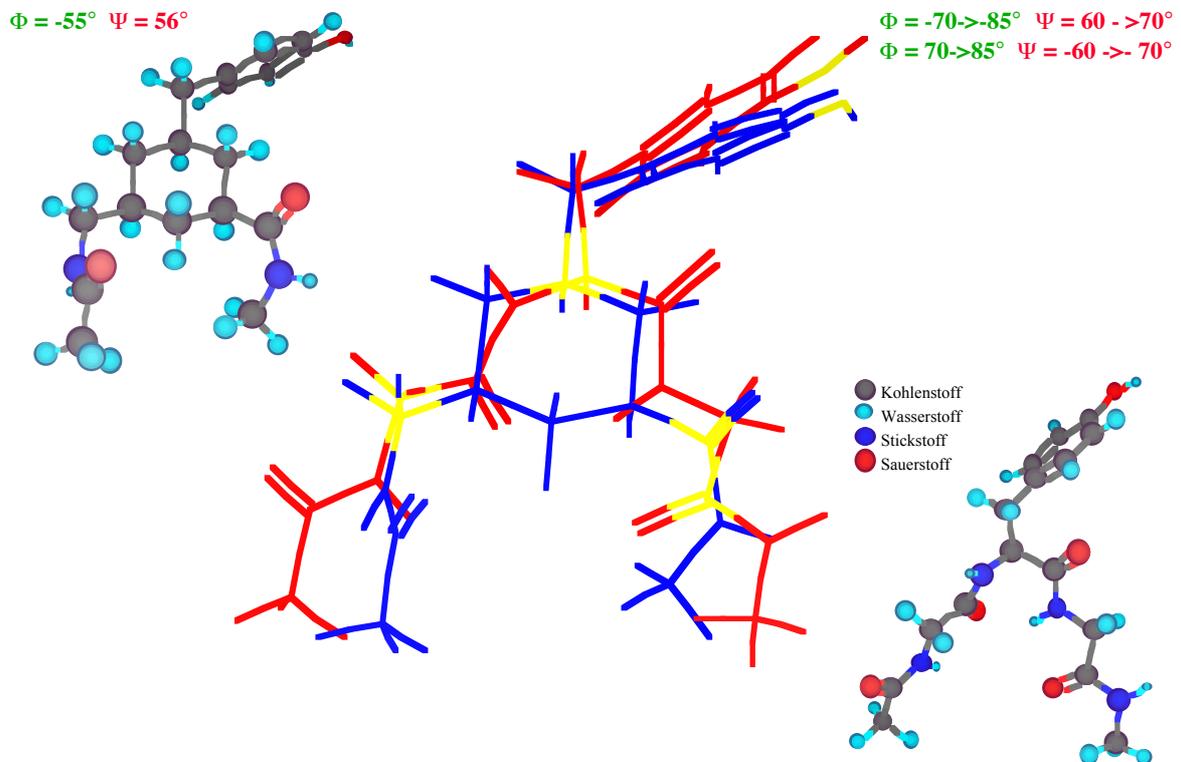
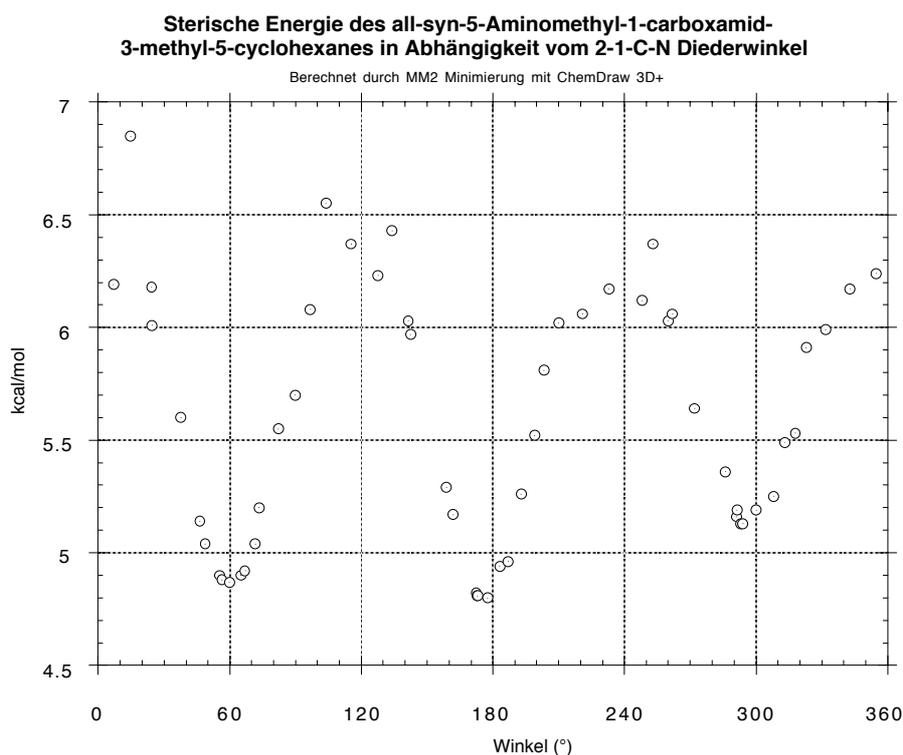


Bild 59

Die energetische Abhängigkeit der Ausrichtung der Carbonylgruppen in unterschiedliche Raumrichtungen wurde durch eine Konformationsanalyse in ChemDraw 3D⁺ untersucht. Die Abhängigkeit des Diederwinkels C2-C1-C(O)-NH₂ eines vereinfachten Alanin-Analogons ist in Bild 60 dargestellt.

**Bild 60**

Aus dieser Auftragung der relativen Energie (kcal/mol) gegen den Diederwinkel Ψ sind die 3 Vorzugskonformationen und ihre Inversionsbarrieren zueinander ersichtlich. Die geringe Höhe der Inversionsbarrieren deutet auf eine freie Rotation des Amides hin. Die Berechnungen an einem entsprechenden C₁-verlängerten Cyclohexylethanamid (Bild 61) weisen auf eine noch freiere Drehbarkeit mit weniger ausgeprägten Inversionsbarrieren hin. Der Vergleich berechneter Kern-Strukturen für Metatheseprodukte und cyclische Disulfide *cyclo*-Ac-NMGly-Ala-NMGly-NH₂ und Ac-Cys-Ala-Cys-NH₂ (AcCACNH₂) erklärt auch die schlechte Bindungsaffinität des rahmenverschobenen Disulfides. Während die abgebildeten MM2 Berechnungen (Bild 62) und *Amber*-Kraftfeldberechnungen (Bild 63) stets die Dominanz der γ -Schleife für AcCACNH₂ widerspiegeln, führen entsprechende Berechnungen zu einer offenen Schleifenstruktur für das isomere *N*-verknüpfte Disulfid.

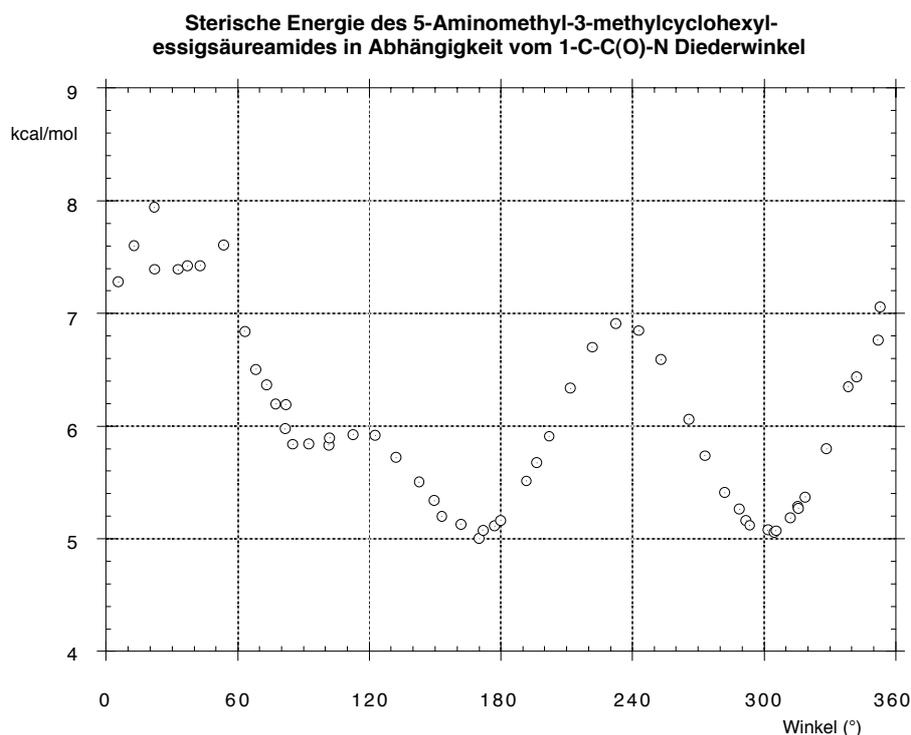


Bild 61 Berechnung der Rotierbarkeit der Amidgruppe eines Homocyclohexanes

Insbesondere die fehlende, indizierte Wasserstoffbrücke und die resultierende Fehlordnung, sowie die fehlende Interaktion des $i+2$ Amid-Wasserstoffes mit dem Rezeptor, spiegeln sich wider in der geringen Bindungsaffinität. Die *Amber*-Kraftfeldberechnungen an *cyclo*-Ac-Cys-Tyr-Cys-NHMe (**11**) und *cyclo*-Ac-NMGly-Tyr-NMGly-NHMe (**12**) (Bild 63) mit GB/SA Modell für H₂O-Solvatisierung ergaben 439 Strukturen innerhalb einer Energiebarriere von 20 kJ/mol zur energieärmsten Struktur. Viele der gefundenen Minima weisen β -Faltblatt-typische Diederwinkel (Bild 63) des Tyrosyl ($i+2$) auf. Innerhalb der Grenzwerte $\Psi_{\text{Tyr}} = 65 \pm 20^\circ$, $\Phi_{\text{Tyr}} = -75 \pm 20^\circ$ und $\Psi_{\text{Tyr}} = -65 \pm 20^\circ$, $\Phi_{\text{Tyr}} = 75 \pm 20^\circ$ konnten keine γ -Schleifen (und nur eine $\beta\text{II}'$ -Schleife) identifiziert werden. Die von G. R. Marshall¹⁴⁹ postulierte offene Schleifenstruktur des Ang II, die mit den Diederwinkeln $\Psi_{\text{Tyr}} = 65^\circ$ und $\Phi_{\text{Tyr}} = -130^\circ$ gerade zwischen β -Faltblatt und γ -Schleife angesiedelt ist, findet sich nicht unter den Minima innerhalb einer Energiegrenze von 20 kJ/mol.

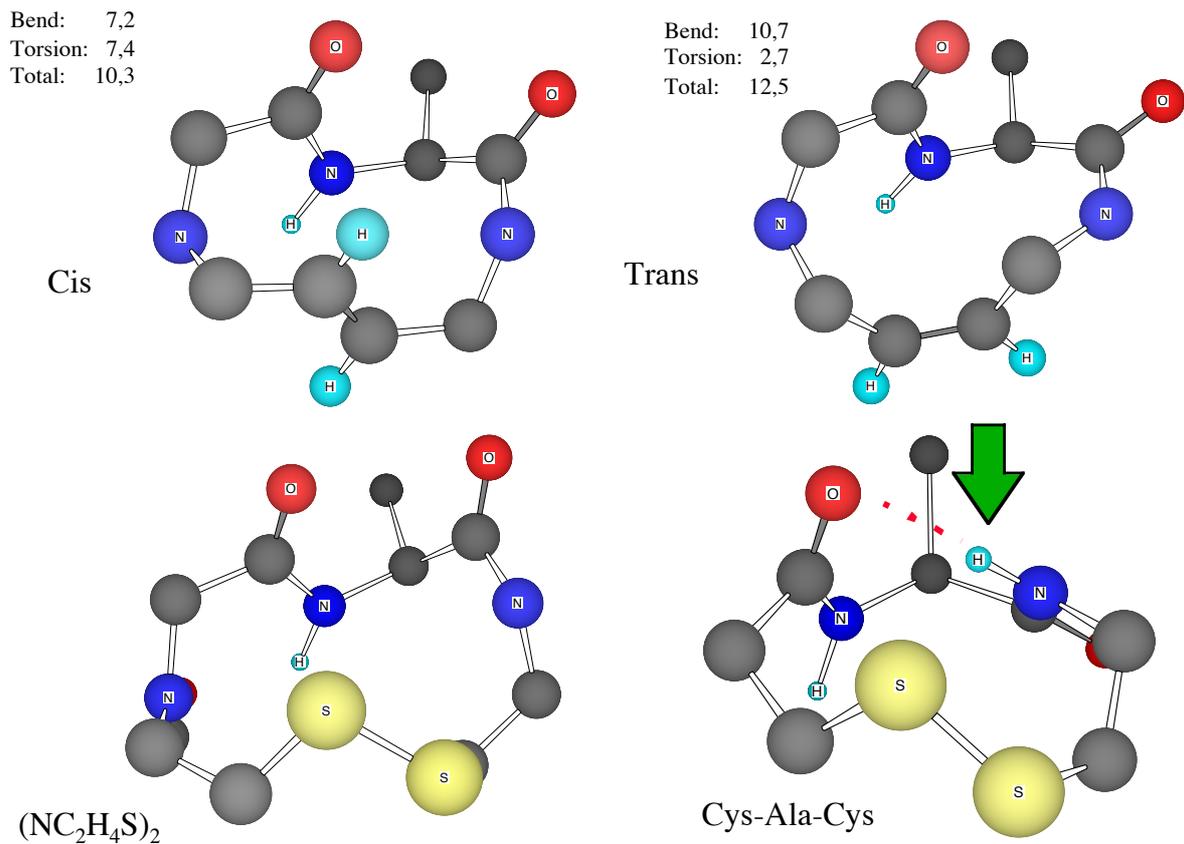


Bild 62 MM2 Berechnungen an NMgly

Marshall's Nachweis der Nichtadditivität der Rückgratmodifikationen belegt die geringe Bedeutung der Rückgratgeometrie, essentiell ist jedoch die Positionierung der pharmakophoren Gruppen. Die einzige relevante, 3-dimensionale Ang II-Rezeptorinformation, die bis heute zur Verfügung steht, ist ein Ang II-Antikörperkomplex.¹⁵⁵ Der entwickelte anti-anti-idiotypische Antikörper bindet Ang II in guter Affinität (10^{-10} M), aber die Röntgenstrukturanalyse des gebundenen Ang II läßt sich nicht mit der Aktivität cyclischer Ang II-Analoga vereinbaren.¹⁴⁹ In dem kompakten Ang II-Antikörperkomplex werden 2 Schleifen beobachtet: Ile-His-Pro und Asp-Arg. Zusätzlich kommt es zur Ausbildung einer Salzbrücke zwischen Asp und His. Durch Mutationsexperimente ist aber bekannt, das Asp¹ mit dem His¹⁸³ des Rezeptors interagiert.⁸⁵ Dies steht im Gegensatz zur Antikörper-gebundenen Konformation.

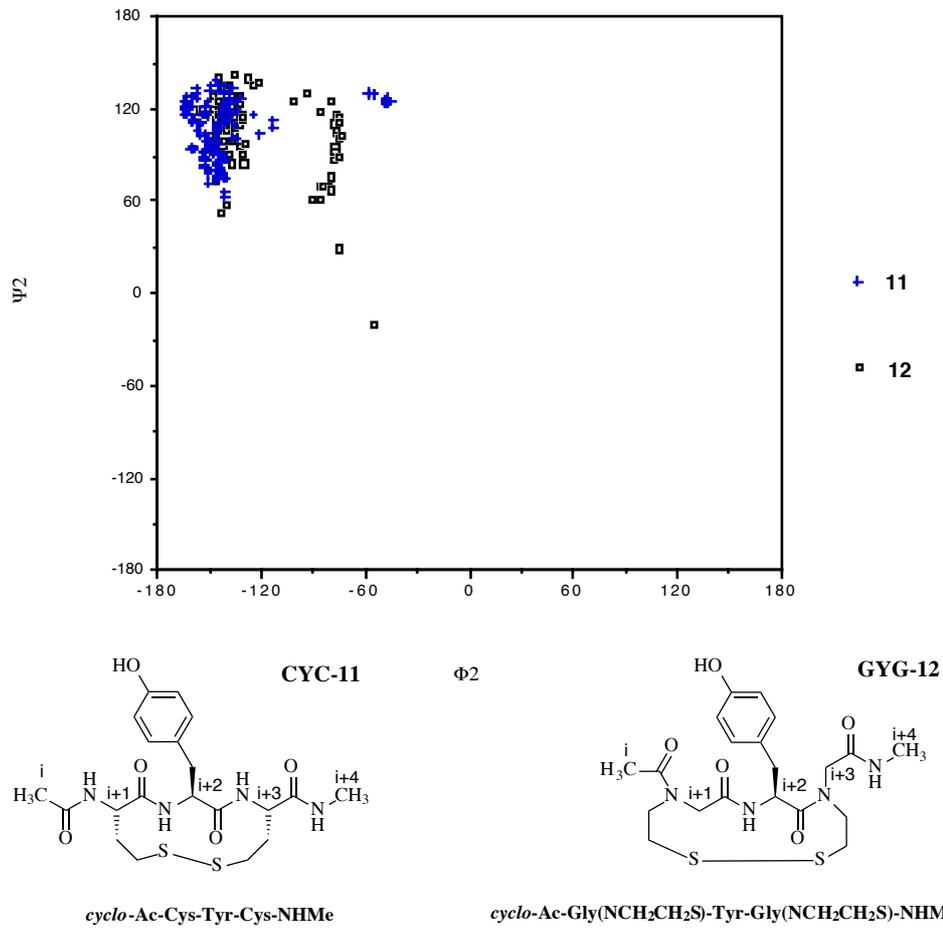


Bild 63 Ramachandran Plot für Ψ_2 CYC-11 und GYG-12

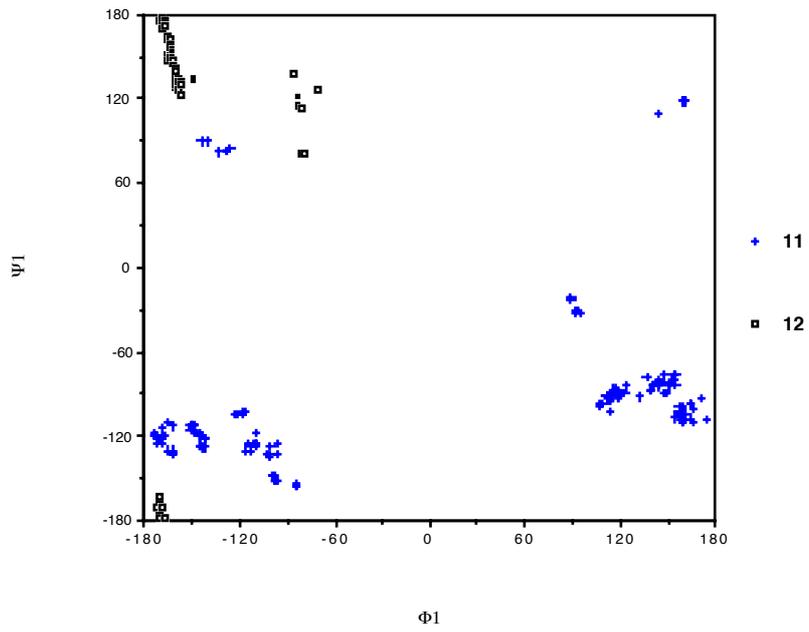


Bild 64 Ramachandran Plot für Ψ_1 CYC-11 und GYG-12

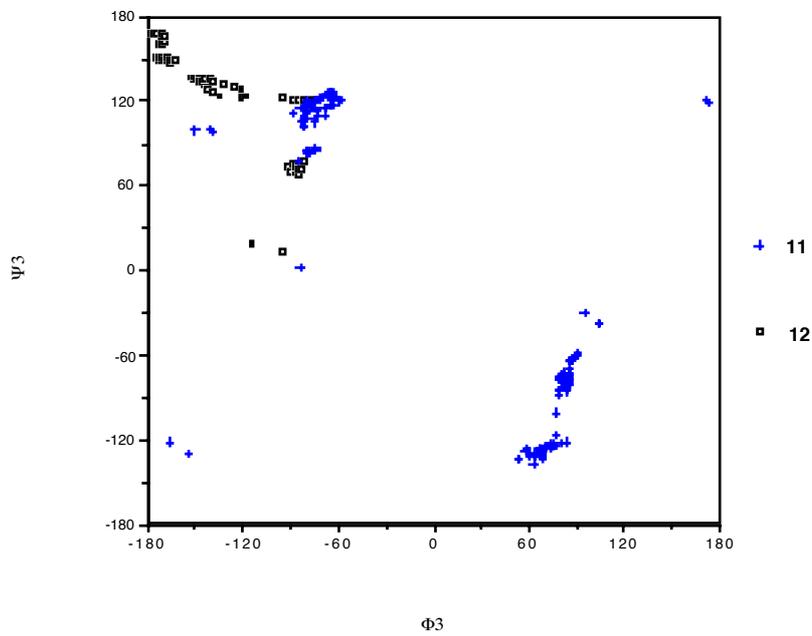


Bild 65 Ramachandran Plot für Ψ_3 CYC-11 und GYG-12

Zusammenfassung

In Anbetracht des untersuchten konformativen Raumes, der guten Übereinstimmung der Peptidmimetika mit γ -Schleifendiederwinkeln und der Untersuchungen^{154,156,157} durch Samanen und Marshall¹⁴⁹ wird die Präsenz einer echten γ -Schleife ausgeschlossen. Für die Untersuchung des konformativen Raumes wurde die CycloscanTM-Technik adaptiert und präparativ vereinfacht als *Frame-Shifted* Technik entwickelt. Für die Synthese der Cyclohexanmimetika wurde eine neue, diastereoselektive Synthese von 1,3,5-all äquatorial substituierten Cyclohexanen entwickelt. Die guten Bindungsaffinitäten der synthetisierten Lactammimetika werden auf eine analoge Präsentation der pharmakophoren Gruppen der Mimetika und Ang II im rezeptorgebundenen Zustand und nicht auf die Rückgratgeometrie zurückgeführt.

II. N-Boc-(2,6-bis-(ethoxycarbonyl-pyridin-4-yl)-alanin und seine Derivate als Tridentate Liganden

Kinase-Inhibitoren und nicht-radioaktive Marker?

Die Komplexierung von Übergangsmetallen durch Aminosäuren ist eine gut dokumentierte Methode um die Sekundär- und Tertiärstruktur von Peptiden und Proteinen und damit ihre Aktivität zu kontrollieren.^{158,159} Auf dem Weg zu synthetischen Kinase-Inhibitoren, Kinase-Markierern und dem *de novo* Design synthetischer Haloperoxidasen^{160,161} mit der Substruktur **1** sind 4-substituierte 2,6-Pyridindicarboxylate wie **7a,b** und **13** von besonderem Interesse. Ein Pyridinstickstoff, flankiert von 2 Donorsystemen, ist ein idealer tridentater Ligand. Die Variationen des Donors (**D**) und des pH-Wertes erlauben die selektive Koordination von Kationen wie: Zn(II), V(V), Eu(III), Cu(I) und Tc(VII). Der Einbau dieser Chelatoren in Peptide oder Proteine ermöglicht den Zugang zu neuartigen Peptidmimetika und Enzyminhibitoren mit neuer oder verbesserter Aktivität. Die Veränderungen von Polarität und Geometrie, in Verbindung mit zusätzlichen freien Koordinationsstellen, bieten die Möglichkeit zur Kontrolle der Sekundärstruktur.

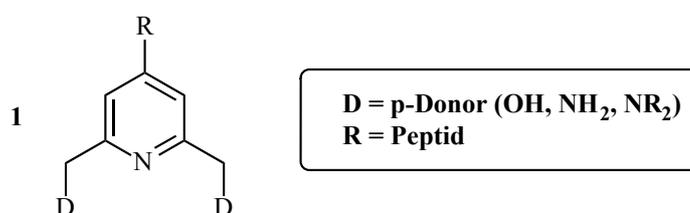


Bild 66

Eine zusätzliche Anwendung bietet sich in der Reinigung und Identifizierung von Peptiden durch *Immobilised Metal Affinity Chromatography* (IMAC) an.¹⁶² Der Einbau der tridentaten Liganden in Peptide oder Oligonukleotide ermöglicht den Zugang zu neuartigen Zink-Finger-Inhibitoren, Kinase-Markierer sind durch Technetium und Europium¹⁶³ erhältlich, synthetische Enzyme durch Vanadium(V). Ausgehend von dem

bekanntes Dipicolinderivat¹⁶⁴ (Bild 67) ist durch eine Variation von Solvens, pH-Wert und Oxidationsmittel die Entwicklung einer synthetischen Oxidase oder Haloperoxidase möglich.

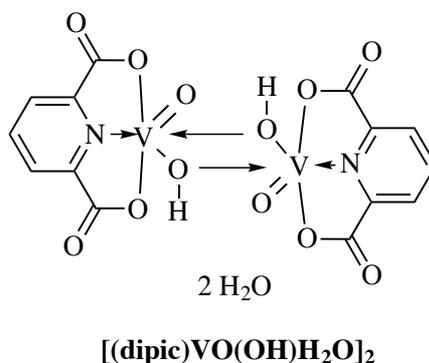


Bild 67

Takalo^{165,166} berichtete die Synthese der Pyridine **3** und **4**, die sich wegen des Bromsubstituenten als Startmaterial für die gesuchten Liganden anbieten. Ausgehend von der kommerziellen Chelidamsäure **2** erhält man durch Bromierung mit PBr_5 und Veresterung mit Ethanol den Diester **3**. Der kristalline Diester **3** wird direkt aus dem Ansatz durch Zugabe von Eiswasser erhalten, die wiederholte Kristallisation liefert das Produkt in 70% Ausbeute (Lit. $\approx 50\%$) und vermeidet aufwendige Chromatographie.

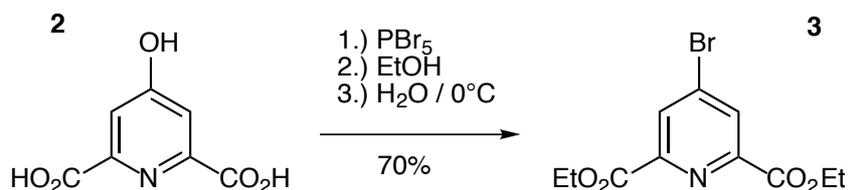
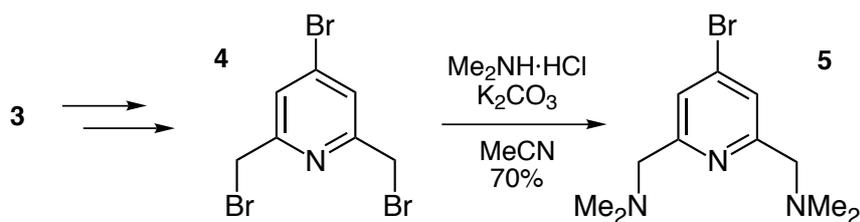
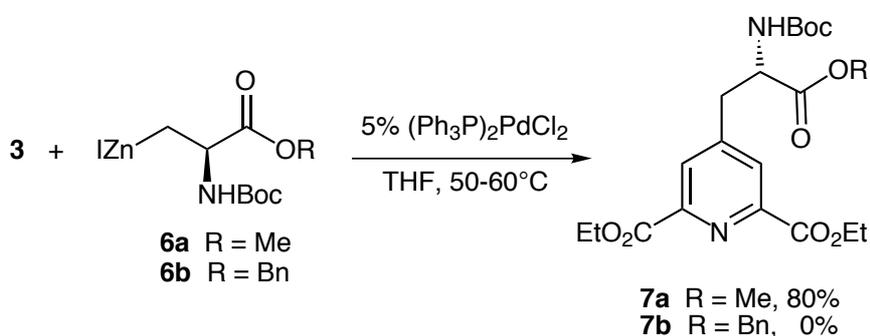


Bild 68

Die anschließende Reduktion des Diesters **3** mit NaBH_4 ¹⁶⁵ und Umsetzung mit PBr_3 ergibt das Tribromid **4**. Die Substitution mit Dimethylamin liefert den Liganden **5** in guter Ausbeute.

**Bild 69**

Die Verknüpfung der Chelatoren zu chiralen Aminosäuren erfolgt durch Palladium-katalysierte Kupplung der Bromopyridine und Jacksons^{167,168} Zink-Reagenz **6a** und **6b**.

**Bild 70**

Der Methylester **7a** wird in guter Ausbeute gebildet, er entzieht sich bislang aber einer selektiven Entschützung. Der entsprechende Benzylester **7b** wird nur in Spuren gebildet, es überwiegt die Bildung von Didehydroalanin. Dies führe ich auf die schlechtere Stabilisierung des Zink-Reagenzes durch den Benzyl-Sauerstoff zurück. Der vereinfachte analoge Triester **10** wird aus **8** und **9** in guter Ausbeute erhalten, läßt sich aber nur unselektiv spalten. Deshalb entwickelten wir (B. Schmidt, D. Ehlert) den Zugang zu den Substraten **11a-c** durch Heck-Olefinierung¹⁶⁹ von Acrylestern **9a-c**. Diese Reaktion verläuft mit den wohlfeilen Estern in guten Ausbeuten unter sehr einfachen, nicht-inerten Reaktionsbedingungen.

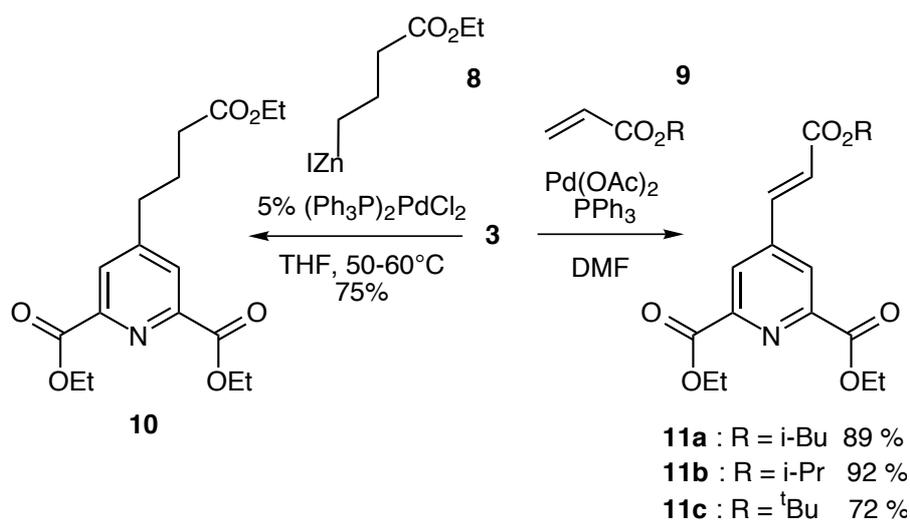


Bild 71

Durch die Hydrierung der Doppelbindung erhielten wir die orthogonal geschützten Triester **12a,c** und durch anschließende Behandlung von **12c** mit Trifluoressigsäure die kristalline Säure **13**.

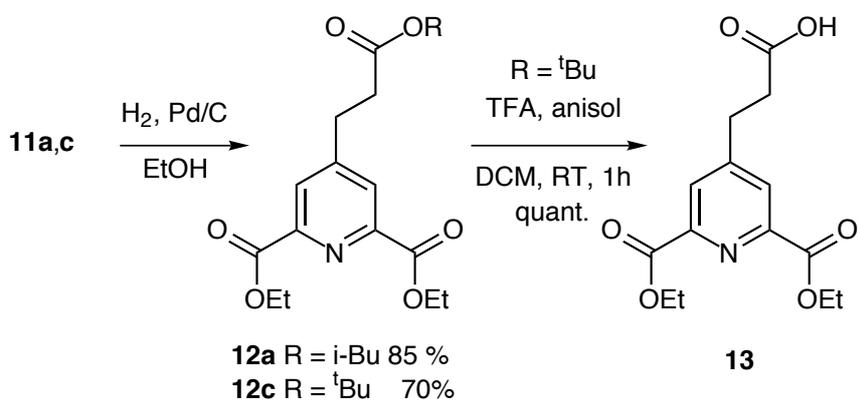
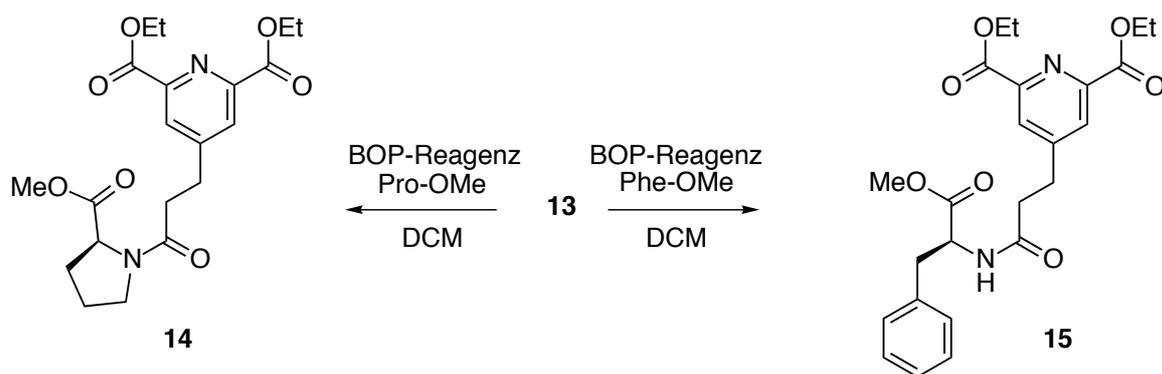
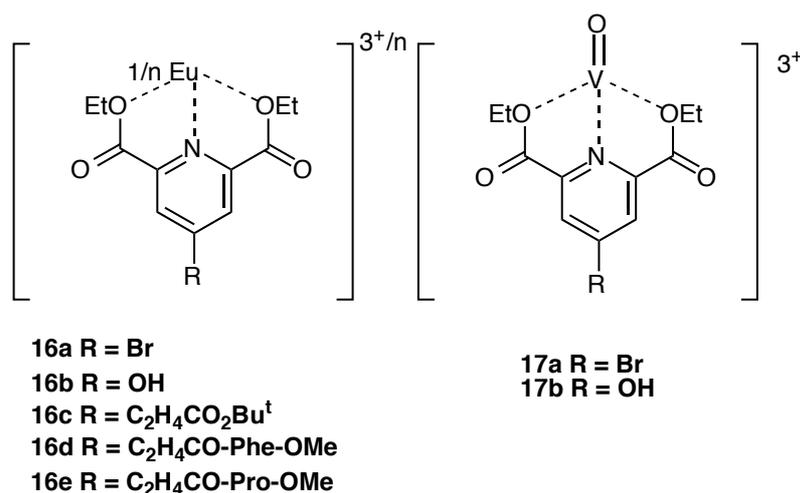


Bild 72

Durch Kondensation der Säure **13** mit den Aminosäureestern von Prolin und Phenylalanin haben wir die Dipeptide **14** und **15** erhalten.

**Bild 73**

Anschließend stellten wir die Europium(III)-Komplexe dar (Bild 74). Die photochemischen Anwendungen dieser Europium-Komplexe sind Gegenstand der laufenden Untersuchungen in enger Kooperation mit der Firma EVOTEC, Hamburg.

**Bild 74**

Fluoreszierende Marker ersetzen zunehmend die klassischen radioaktiven Isotope in biologisch-medizinischen Untersuchungen. Wesentliche Gründe dafür sind die verbesserte Stabilität, die reduzierten Kosten für Anschaffung und Entsorgung, der verringerte Verwaltungs- und Genehmigungsaufwand und die verbesserte räumliche Auflösung.¹⁷⁰ Nachteilig ist jedoch das stärkere Signalrauschen durch Eigenfluoreszenz der Substrate. Die Entkopplung der Signale von aromatischen Aminosäuren und Fluoreszenzfarbstoffen kann

durch die Wellenlänge aber auch durch zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie erfolgen. Für die selektive Photonenemission wurde eine Reihe von Verfahren entwickelt:

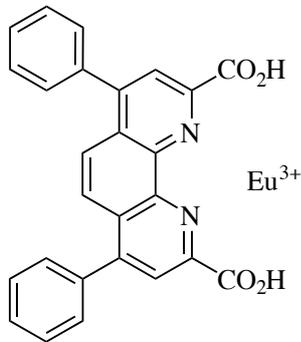
Verfahren	Beispiele
Photolumineszenz	Fluoresein, Europium Chelate
Chemolumineszenz	Luminol, Merrettichperoxydase
Biolumineszenz	Luciferase
Elektrochemolumineszenz	Ruthenium(II)bipyridylkomplexe

Diese Verfahren finden Anwendung im *high-throughput screening* von Verbindungsbibliotheken, Fluoreszenz-aktivierter Zell-Sortierung (FACS), konfokaler Fluoreszenzmikroskopie und Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie. Die Limitation durch die Eigenfluoreszenz der untersuchten Substrate konnte durch verbesserte Selektivität und zeitabhängige Aufnahme derart verbessert werden, daß im Grenzbereich einzelne Moleküle nachgewiesen werden können und damit auch die Wellenlängenbarriere der Auflösung unterschritten wurde.¹⁷¹⁻¹⁷³ Während chemolumineszente Substrate im Zerfall nur ein Photon erzeugen, und darin den Radionukleiden ähneln, können Fluorophore 10^4 - 10^5 Photonen vor ihrem chemischen Abbau emittieren. Eine weitere Möglichkeit zur Verringerung des Signal-Rauschabstandes bietet sich durch Fluorophore mit hoher Stokes-Verschiebung an. Der hohe Frequenzunterschied von Anregung und Emission erlaubt die Differenzierung des Signales. Für die zeitaufgelöste Spektroskopie in Immunoessays wurde eine Reihe von Lanthanid-Chelatkomplexen eingesetzt, besonders geeignet erwiesen sich Eu^{3+} , Dy^{3+} , Sm^{3+} und Tb^{3+} . Die häufigste Anwendung findet Europium(III), dies wegen der besonders großen Stokes-Verschiebung und der lang andauernden Fluoreszenz. Durch die Kombination von Filtern und Zeitauflösung kann das Grundrauschen leicht eliminiert werden. Weitere Implikationen bei der Fluoreszenzmarkierung entstehen durch die vorhandene Technik; Fluorophore, die auf etablierten Meßverfahren basieren und weit verbreitete Laborgeräte verwenden, setzen sich leichter durch. Deshalb sind Fluorophore, die sich durch den Argon-Laser (488 nm) anregen lassen, weit verbreitet. Ähnliche Präferenzen entstehen aus der Unempfindlichkeit üblicher Luminometer gegenüber UV-Licht < 360 nm.¹⁷⁰

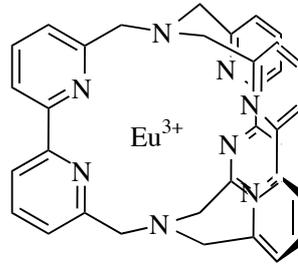
Die Anforderungen an den idealen Marker sind deshalb:

- Verwendung üblicher Technik (Wellenlänge)
- physikochemisch inert zum untersuchten Substrat
- Wasserlöslichkeit
- hohe Stokessche Verschiebung

Fluorescein ist ein nahezu idealer Fluorophor: es ist wasserlöslich, stabil und durch den Argon-Laser (488 nm) anregbar. Aber es fluoresziert nicht in sauren Lösungen und ist deshalb für viele Anwendungen ungeeignet.



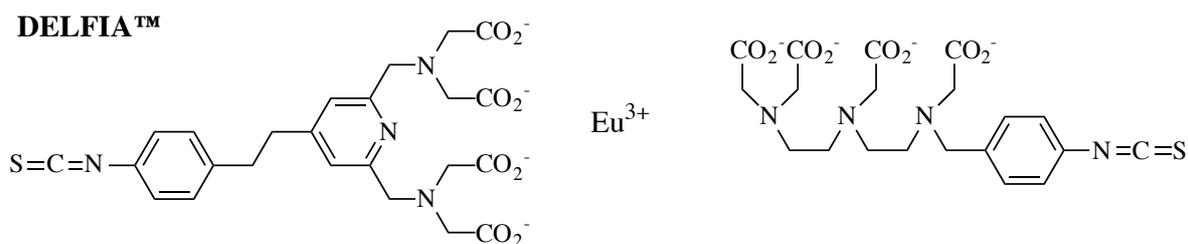
E. P. Diamandis et al.



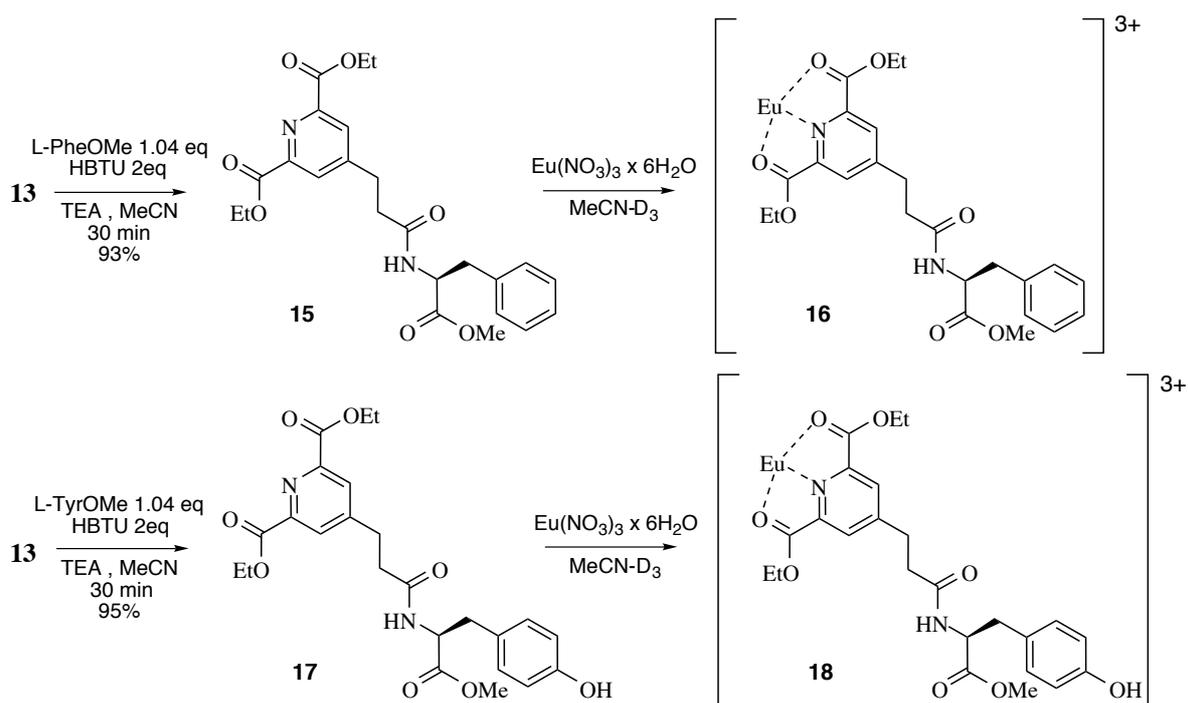
J.-M. Lehn
G. Mathis

Bild 75

Das am weitesten entwickelte Cyberfluor-System basiert auf dem Eu^{3+} -Komplex einer Phenanthrolin-2,6-dicarbonsäure (Bild 75).¹⁷⁴ Ein Nachteil des Systemes liegt in der notwendigen Trocknung des Assays (Gel, Blot, Mikrotiterplatte). Der von J.-M. Lehn entwickelte Kryptand wurde eingesetzt für DNA-Analyse¹⁷⁴ und Protein-Interaktionen.¹⁷⁵

**Bild 76**

Das DELFIA™ System¹⁷⁶ ist für den Einsatz in Peptid und Nucleinsäuremarkierung entwickelt worden. Die Anknüpfung der Eu(III)-Chelatoren erfolgt durch Reaktion von Isothiocyanaten mit den Aminogruppen des Substrates.¹⁷⁰ Während die Nucleinsäureaddukte stabil sind, sind N-terminal markierte Peptide instabil, weil sie durch Edmann-Abbau die Markierung verlieren können. Eine stabile Markierung von Peptiden und Proteinen erfolgt jedoch durch die Lysin-Seitenketten.

**Bild 77**

Für den Test als Fluoreszenzmarker haben wir die Pseudopeptide **15** und **16** durch Kondensation von **13** mit Tyrosin- und Phenylalanin-Methylester dargestellt. Das zeitaufge-

löste Fluoreszenzverhalten und der photoinduzierte Elektronentransfer zwischen den aromatischen Aminosäuren und dem chelatisierten Eu(III) ist Gegenstand einer Industriekooperation. Die Komplexbildung des Europium durch die Pyridyldiamideinheit wurde bestätigt durch Titration mit $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ in MeCN-D_3 . Die Verfolgung der Titration durch ^1H NMR-Spektroskopie (Bild 78) schließt die Koordination durch das Phenylalanin aus. Lediglich die aromatischen Protonen und die Ethylgruppen erfahren eine Verschiebung zu einem Maximum. Die Verschiebungsrichtung und die Signalstärke unterscheiden sich von denen eines einfacheren Systemes, das von Piguet und Bünzli berichtet wurde.¹⁷⁷ Deshalb ist ein Strukturvorschlag zur Zeit nicht möglich. Die hohe Dissoziation der Europium-Ligand-Komplexe in wässriger Lösungen macht sie für die Markierung von biologisch aktiven Substanzen ungeeignet, deshalb wurden die analogen *bis*-Diethylamide **19-23** (Bild 79) dargestellt.

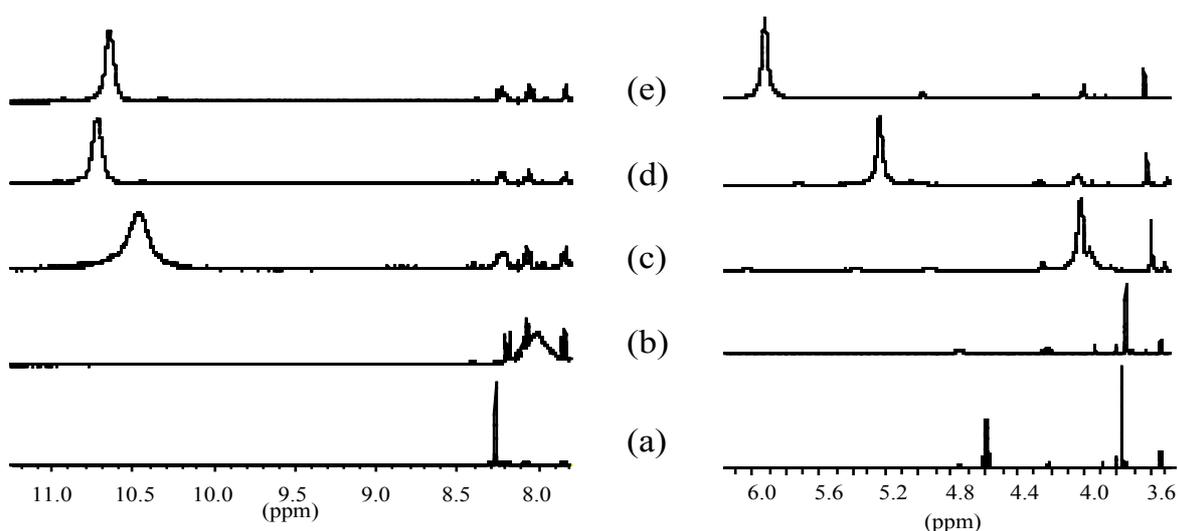


Bild 78 alle Proben in MeCN-D_3 , 400 MHz (a) **15**, (b) 0,12 eq $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$, (c) 1,2 eq $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$, (d) 1,6 eq $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$, (e) 2,3 eq $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$.

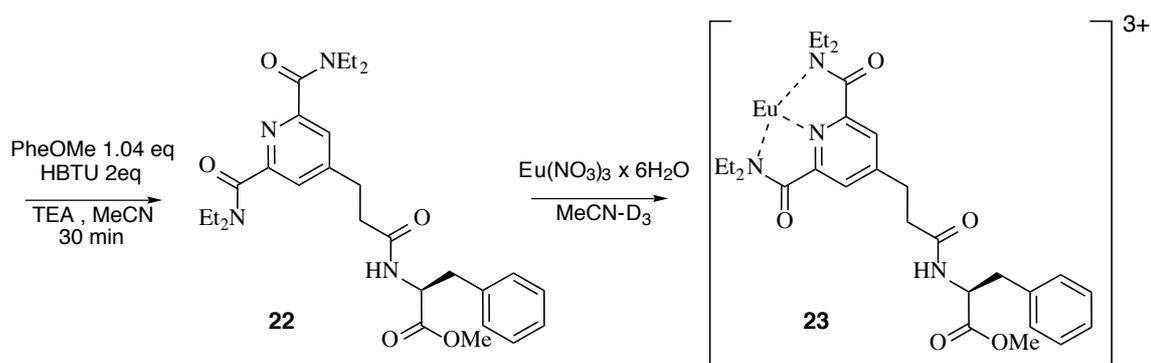
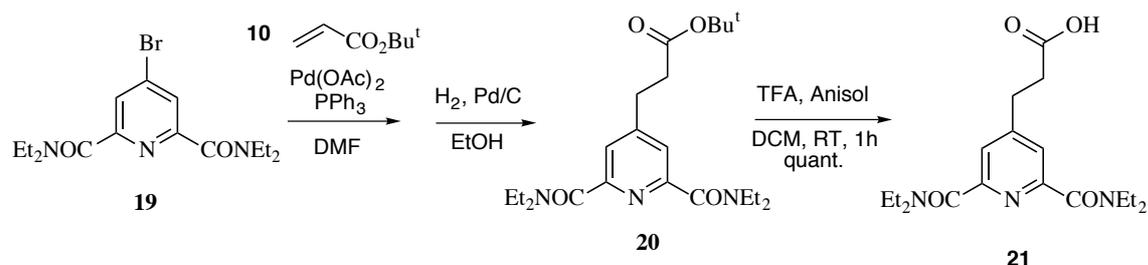


Bild 79

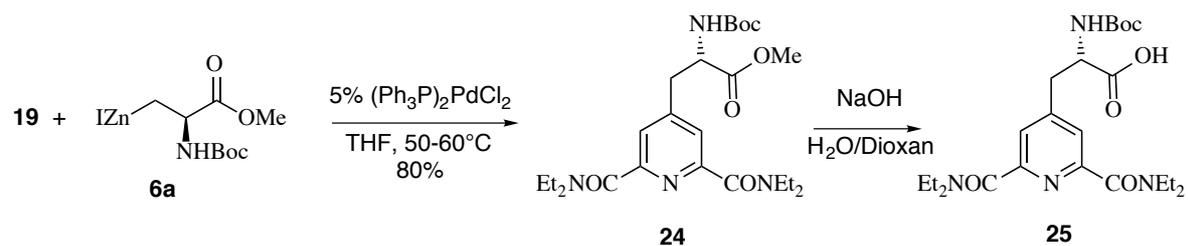


Bild 80

Die chiralen Aminosäurederivate wurden analog zu den Estern dargestellt. Diese *bis*-Diethylamide eignen sich auf Grund der prochiralen Umgebung der Ethyl-CH₂-Protonen besonders zur ¹H NMR spektroskopischen Untersuchung, weil sich aus ihren unterschiedlichen Verschiebungen und Kopplungen auf die 3-dimensionale Struktur schließen läßt. Die Metalle werden dabei von bis zu 3 Liganden koordiniert, es entstehen mit dem Liganden **20** chirale Helices, allerdings als Razemat. Chirale Liganden wie **24** oder Peptide von **25** sollen zu diastereomeren helicalen Komplexen führen. Entsprechende Untersuchungen erfolgen z.Z. in Kooperation mit Prof. Piguet und Prof. Bünzli (Schweiz).

Tabelle 5
Bindungskonstanten der Liganden mit Ln(III) in MeCN bei 25°C

Verbindung	Metallkation	Gegenanion	K1	K2	K3
12c	La(III)	ClO ₄ ⁻	7,4	6,6	5,0
12c	Eu(III)	ClO ₄ ⁻	8,2	6,3	5,3
12c	Lu(III)	ClO ₄ ⁻	8,7	6,6	5,0
20	La(III)	ClO ₄ ⁻	7,4	7,4	6,2
20	Eu(III)	ClO ₄ ⁻	8,3	7,0	6,2
20	Lu(III)	ClO ₄ ⁻	8,1	7,1	7,7

Die unveröffentlichten Meßergebnisse wurden von Prof. C. Piguet zur Verfügung gestellt. Die Bestimmung erfolgte analog zu 2,6-Bis(ethoxycarbonyl)pyridin.¹⁷⁷

Die Komplexkonstanten wurden bestimmt durch Faktorenanalyse anhand der korrigierten UV-Spektren bei konstanter Ligandenkonzentration in Abhängigkeit vom Lanthanid-zusatz. Ein derartiges Konzentration/Absorptionsdiagramm ist für **12c** und Eu(OSO₂CF₃)₃ angegeben (s. folgende Seite).

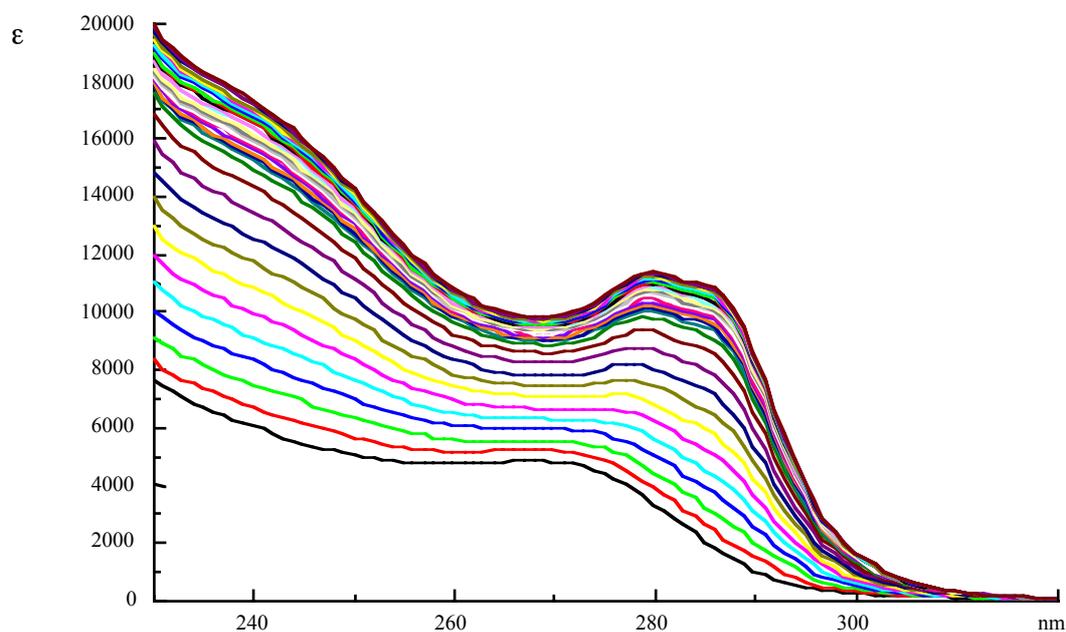


Bild 81 Korrigierte Absorptionsspektren (Verdünnung) der Titration von **12c** $7,2 \cdot 10^{-4}$ mol/L und $\text{Eu}(\text{OSO}_2\text{CF}_3)_3$ $1,7 \cdot 10^{-3}$ mol/L in MeCN, 0,1 mol/L Et_4NClO_4 . Eu:12c 1:0 bis 1,5:1 in 25 proportionalen Konzentrationsschritten. Zur Verfügung gestellt von Prof. C. Piguet.

Für die Anwendung als nicht-radioaktive Marker¹⁷⁰ sind Fluorophor-gekoppelte Metallkomplexe durch die Firma Evotec (Hamburg) patentiert. Diese Nickelkomplexe werden bislang durch das His-His-His-Motiv des IMAC-Systemes an Peptide komplexiert. Als einfacheres Verbindungsglied zwischen Peptiden oder Nucleinsäuren ist deshalb ein π -Box-Ligand mit einfacher Verknüpfung durch SPPS von besonderem Interesse. Für diese Anwendung sind *o,o'*-bis-Dialkylaminopyridine besonders geeignet. Diese Liganden sind durch die bereits beschriebenen Kupplungen in idealer Weise zugänglich geworden (Bild 82, Bild 83).

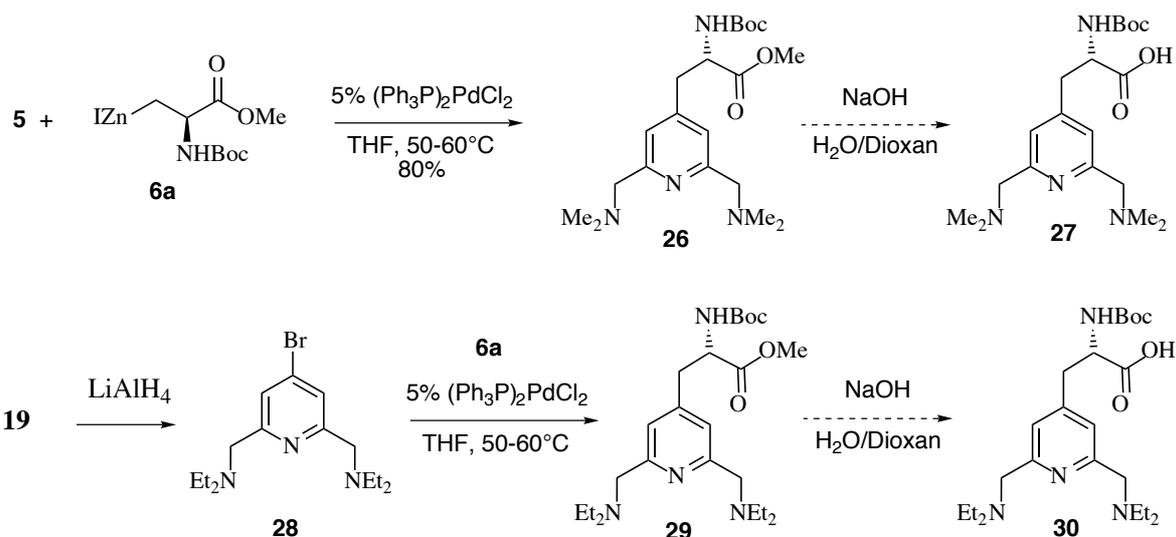


Bild 82

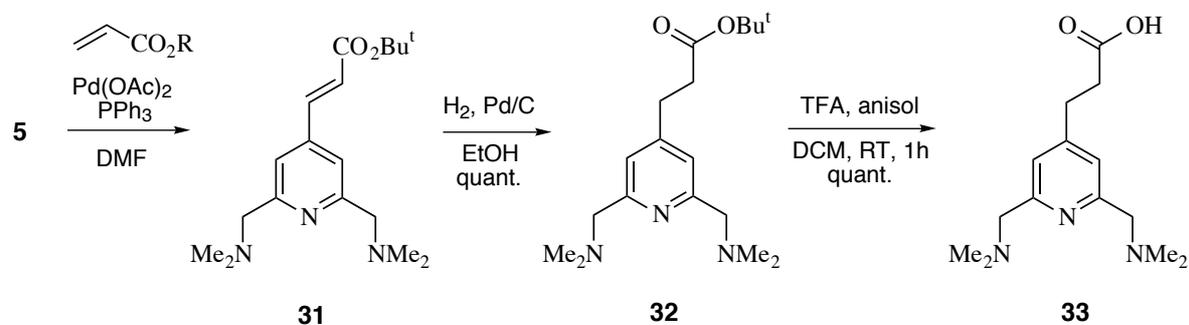


Bild 83

Zusammenfassung

Die in diesem Kapitel beschriebenen tridentaten Liganden sind als System komplementär. Sie eignen sich sowohl zum Einbau in Peptide aber auch als ihr *N*-terminaler Abschluß. Der terminale Einsatz in Nucleinsäuren ist ebenso möglich. Ihre Markierungseignung als Fluoreszenzmarker in Kombination mit Lanthaniden und der Einsatz als selektive Nickel-chelatoren werden in einer Industriekooperation untersucht. Die Eignung als Protein-Tyrosyl-Kinase Inhibitor⁶⁹ wird in Zusammenarbeit mit dem *Biomedicinska Centrum* der Universität Uppsala am Dekapeptid Angiotensin I untersucht.

III. Geschwindigkeitsbeschleunigung der Dihydroxylierung von Olefinen und OsO₄ durch Druck

Die Osmium-katalysierte Dihydroxylierung von Olefinen ist eine synthetisch außerordentlich nützliche Reaktion. Ausgehend von Criegees¹⁷⁸ Arbeit von 1942, in der er bereits die Ligandenbeschleunigung durch Pyridin berichtete und auch die wesentlichen Aspekte der Reaktion beschrieb, wurde die Reaktion stetig weiterentwickelt. Bereits in dieser Publikation wurde auch der noch heute gültige "Lehrbuch-Mechanismus" der Reaktion vorgeschlagen. Dennoch war zu dem Zeitpunkt die heutige Bedeutung dieser Reaktion nicht absehbar. Ein Meilenstein auf dem weiteren Weg war die stöchiometrische, asymmetrische Dihydroxylierung durch Sharpless et al.. Aber erst die katalytische, asymmetrische Variante^{179,180} hat das Synthesepotential dieser Reaktion, die üblicherweise als *Sharpless AD* angegeben¹⁸¹ wird, vervielfacht.

Die Reaktion ist inzwischen etabliert, eine Reihe von speziellen Liganden wurde entwickelt um mit nahezu allen Olefinen hohe optische Reinheit der resultierenden Glycole zu erzielen. Lediglich die *cis*-konfigurierten Olefine weisen unbefriedigende Enantiomerenüberschüsse der gebildeten Glycolate auf. Trotz aller unternommenen Versuche, die in 2 exzellenten Übersichten zusammengefasst wurden,^{179,180} fehlt der experimentelle Nachweis für den Reaktionsmechanismus. Die Kontroverse um den Mechanismus wird angeführt durch die Arbeitsgruppen um K. B. Sharpless und E. J. Corey. Neben diesen renommierten Gruppen beteiligen sich weitere Arbeitskreise an der Diskussion um den zu Grunde liegenden Mechanismus.¹⁸²⁻¹⁸⁶ In den diskutierten Modellen wird eine konzertierte [3+2]-Cycloaddition bzw. ein schrittweiser [2+2]-Reaktionsverlauf vorgeschlagen (Bild 86). Während der [3+2]-Mechanismus je nach Anwesenheit von Ligand direkt zu den Endprodukten **5** + **6** führt und damit kein Intermediat aufweist, postuliert der [2+2]-Mechanismus die reversible, schnelle Bildung der Metallaoxetane **2** + **3** aus einem Osmat-Olefin-Komplex. Diese potentiellen Intermediate **2** + **3** sollen dann in einer geschwindigkeitsbestimmten Umlagerung zu den Endprodukten **5** + **6** reagieren. Die asymmetrische Reaktionsvariante, mit ihrer Ligandenbeschleunigung durch China-

Alkaloide, soll sich gerade durch Beschleunigung dieser Umlagerung auszeichnen. Während die [3+2]-Cycloaddition an eine Reihe konzertierter Reaktionen erinnert, gibt es für den [2+2]-Mechanismus nur wenige akzeptierte Beispiele. So verläuft die Oxidation von Alkenen mit Chromylchlorid vermutlich über ein solches Metallaoxetan.¹⁸⁷ Isoliert wurde bislang nur ein entsprechender Platincyclus.¹⁸⁸ Jedoch ist die Analogie zu dem [2+2]-Mechanismus der Olefinmetathese naheliegend.

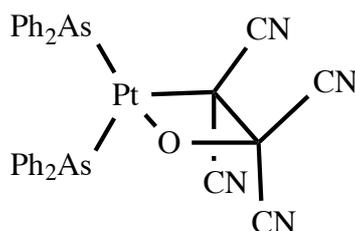


Bild 84

Die Beschleunigung der Reaktion durch gewisse Liganden (*ligand acceleration effect* kurz: LAE) führt zu komplexen Reaktionsystemen, die durch Kinetiken 1. bis 3. Ordnung beschrieben werden können. Deshalb werden die Reaktionsgeschwindigkeiten meist unter Ligandensättigung und bei Konzentrationen gemessen, die zu einer pseudo-1.-Ordnung für Olefin und Osmium führen. Bislang konnten derartige kinetische Messungen nicht genug Argumente liefern um zwischen den beiden Mechanismen zu unterscheiden. Das Auftreten einer Inversionstemperatur bei der Temperaturabhängigkeit der Enantioselektivität¹⁸⁹ führte zur Annahme von zwei konkurrierenden Reaktionswegen bzw. zwei Paaren diastereomerer Übergangszustände mit verschiedenen Enantioselektivitäten in der Umlagerung. Die Eyring-Diagramme über einen Bereich von 100°C, mit der Auftragung des Enantiomerenüberschusses (ee %) gegen 1/T, wiesen für alle Substrat/Katalysator-Kombinationen zwei lineare Bereiche mit einem Inversionspunkt auf und deuten einen Mechanismuswechsel an. Diese Beobachtung wurde von den Befürwortern des konzertierten Mechanismus zunächst nicht erklärt und ist für eine konzertierte Reaktion kaum nachvollziehbar. Dieser Effekt kann aber auch durch den [3+2]-Mechanismus erklärt werden, wenn man eine Änderung der beteiligten Sauerstoffe annimmt. So können im Übergangszustand **A** zwei äquatoriale

Sauerstoffe oder im Übergangszustand **B** ein axialer und ein äquatorialer Sauerstoff transferiert werden.

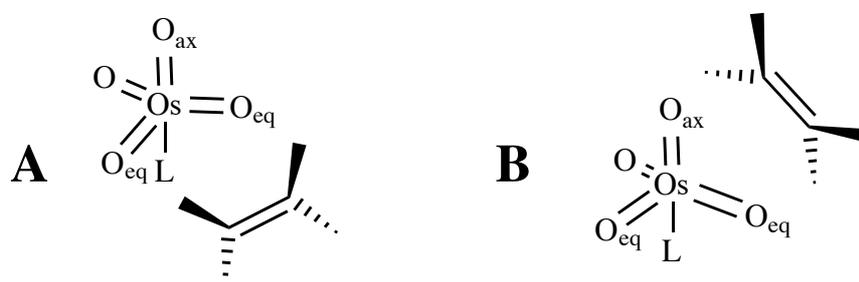


Bild 85

Die Beobachtung einer Michaelis-Menten-Kinetik für die asymmetrische Dihydroxylierung wurde sowohl als Zeichen für einen Osmium-Olefin-Komplex als auch für einen Olefin-Katalysatorkomplex interpretiert und ist deshalb mit beiden Mechanismen vereinbar.¹⁹⁰⁻¹⁹² Im [3+2]-Mechanismus bedingt sie aber ein Prä-Äquilibrium zwischen Olefin und Katalysator zu diastereomeren Komplexen, die anschließend dihydroxyliert werden. Dies erklärt hinreichend den beobachteten Inversionspunkt der Eyring-Diagramme. Der postulierte Komplex kann sowohl aus einer π -d-Orbitalinteraktion als auch einer Aryl-Aryl-Interaktion bestehen. Für die Anordnung einer solchen Aryl-Aryl-Interaktion wurden unterschiedliche Anordnungen postuliert: *Fläche auf Fläche versetzt (slipped)* oder *Kante auf Fläche (edge on)* und experimentell bestätigt.

Die Arbeitsgruppe von K. B. Sharpless erhielt kürzlich bei der kinetischen Untersuchung isotope-markierter Substrate und dem Vergleich mit Reaktionssimulationen Hinweise auf den [3+2]-Mechanismus.¹⁹³ Wegen des hohen zusätzlichen Rechenaufwandes für Chiralalkaloide wurde Ammoniak als Ligand in die Rechnungen eingeführt. Um die Möglichkeiten im [2+2]-Mechanismus einzuschränken, wurde *tert*-Butylethylen als Substrat gewählt. Dies führt zum Vergleich sehr unterschiedlicher Reaktionen, dennoch konnten die vorhergesagten Effekte innerhalb des Nachweisfehlers bestätigt werden.

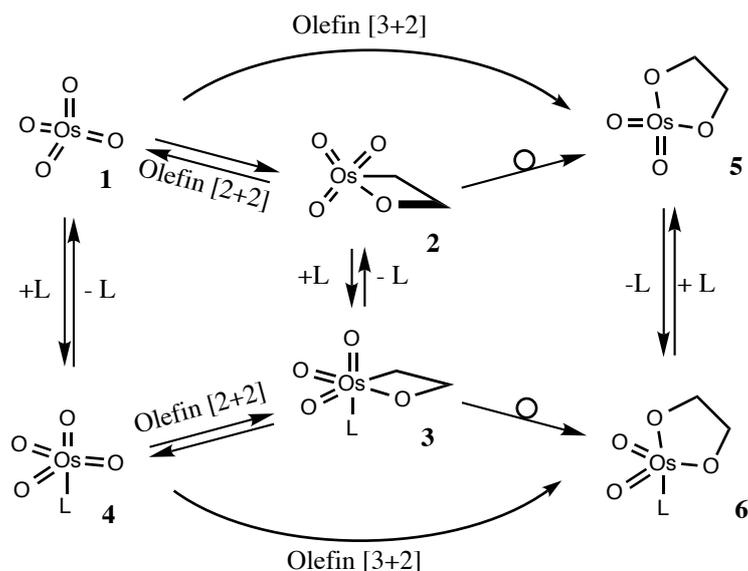


Bild 86 Reaktionsmechanismus, L = Ligand

Die beobachteten Nichtlinearitäten in Hammett-Diagrammen deuten wiederum auf einen Mechanismenwechsel hin, was als Hinweis auf die [2+2]-Addition gedeutet wurde, aber Grenzorbital-Betrachtungen von 1,3-dipolaren Cycloadditionen können dieses Verhalten, trotz einiger Inkonsistenzen, auch für den [3+2]-Mechanismus erklären.¹⁹⁰⁻¹⁹²

Die retrosynthetisch analoge Fragmentierung¹⁹⁰⁻¹⁹² von Rhenium-(V)-glycolaten, deren Metallnucleus isoelektronisch zum Os(VI) ist, verläuft vermutlich über ein derartiges Metallaoxetan. Deshalb wird für die Reaktion von Re(VII)-oxiden mit Alkenen der [2+2]-Mechanismus angenommen. Berechnungen, die auf der *Density functional theory* (DFT) basieren, wurden für beide Reaktionsmechanismen bemüht.^{182,194,195} Zusätzliche DFT-Berechnungen¹⁸² an 4-gliedrigen Ruthenaoxetanen weisen auf ihre hohe sterische Spannung hin, die durch die Umlagerung zu den 5-gliedrigen Glycolaten abgebaut wird. Eine solche geschwindigkeitsbestimmende Umlagerung sollte zu einer Volumenzunahme im Übergangszustand führen und sich somit durch ein positives Aktivierungsvolumen (ΔV^\ddagger) auszeichnen.

Die fortgesetzte Debatte um den Reaktionsmechanismus und die synthetische Bedeutung der Reaktion stimulierte mich zu der Untersuchung der Druckabhängigkeit der Reaktions-

geschwindigkeiten. Ich entschied mich für einfache, stöchiometrische Systeme, da zusätzliche Liganden nicht nur die Reaktion beschleunigen, sondern auch durch druckabhängige Komplexbildungsgleichgewichte die Bestimmung der Elementarschritte äußerst erschweren. Dies geschah mit der Annahme, daß das geschwindigkeitsbestimmende Intermediat, und insbesondere der zu ihm führende Mechanismus, unabhängig von der Anwesenheit eines Liganden sind.

Die Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Druck wurde bereits auf eine große Zahl organischer und anorganischer Reaktion angewandt.¹⁹⁶ Die bekanntesten Beispiele für derartige Beschleunigungen sind sicherlich die Diels-Alder Reaktion und das Haber-Bosch Verfahren. Allgemein gilt, daß die druckabhängige Reaktionsbeschleunigung auftritt, wenn das Volumen des Übergangszustandes (V^\ddagger) kleiner ist als das Gesamtvolumen beider Reaktionspartner.

Mechanismus	ΔV^\ddagger [ml/mol] 25°C	ΔV° [ml/mol] 25°C
[4+2] Diels-Alder (intermolekular)	-25 -> -42	-28 -> -38
[1,3] dipolar	-20 -> -30	-22 -> -27
[2+2] ionisch	-30 -> -50	-27 -> -36
$[\pi_s^2 + \pi_a^2]$	-20 -> -50	-20 -> -31
[3,3] σ	-10 -> -30	≈ 0
Heck-Reaktion ¹⁹⁷	-12 \pm 2	/
[2+2] MeReO ₃ +H ₂ O ₂ ¹⁹⁸	-10,6	/

Bei Reaktionen in Lösung müssen Änderungen der Solvation berücksichtigt werden, dies führt bei Auftreten von Ladungen zu einer hohen Elektrokonstriktion. Die meisten organometallischen Reaktion werden in Gegenwart von stabilisierenden Liganden durchgeführt, daraus ergeben sich zusätzliche Assoziations-Dissoziationsgleichgewichte, wobei

jedes durch eigene Volumenänderungen und Aktivierungsvolumen gekennzeichnet ist. Dies erschwert die Vorhersage oder Interpretation von Druckeffekten auf metallorganische Reaktionen und dementsprechend wenige Beispiele sind publiziert.^{197,199}

Für die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeiten der Dihydroxylierung von Olefinen mit Osmiumtetroxid werden häufig die Lösungsmittel Acetonitril, Benzol und *tert*-Butanol eingesetzt. Die Phasenübergänge von Acetonitril, Benzol (25°C, 0,072 MPa) und *tert*-Butanol schließen jedoch ihre Verwendung bei einem Druck von 600 MPa aus, da die Kristallisation im kritischen Temperatur/Druckbereich stattfindet.²⁰⁰ Phasenübergangsfreie Lösungsmittel wie Methanol, Ethanol reagieren mit OsO₄, Amine und Ether können an OsO₄ koordinieren und komplizieren dadurch kinetische Messungen, sie sind deshalb ungeeignet. Chloroform, Dichlormethan und Toluol sind phasenübergangsfrei bis 600 MPa, aber OsO₄-Lösungen in Chloroform sind instabil.²⁰¹ Die Lösungen in Dichlormethan sind wegen der hohen Flüchtigkeit des Lösungsmittels mit einer hohen Konzentrationsungenauigkeit behaftet, deshalb wurden die Untersuchungen in Toluol durchgeführt.

$\Delta V_{\text{obs}}^{\#}$ besteht aus 2 Anteilen: $\Delta V_{\text{intr.}}^{\#}$, der intrinsischen Volumenänderung der Reaktanden im Aktivierungskomplex und $\Delta V_{\text{solv.}}^{\#}$, der Volumenänderung durch Solvation. Bei auftretenden Ladungen führt dies zur Elektrokonstriktion und äußert sich in $\Delta V_{\text{solv.}}^{\#}$ bis zu 100 ml/mol. Für Reaktionen ohne Ladungstrennung ist der zweite Beitrag jedoch vernachlässigbar, deshalb wurden keine Versuche unternommen um diesen Beitrag ($\Delta V_{\text{solv.}}^{\#}$) zu ermitteln, denn der extrem schwache Substituenteneffekt von Styrolderivaten schließt das Auftreten von Ladungen im Reaktionsverlauf aus.²⁰¹ Eine genaue Bestimmung wird überdies durch die wenigen geeigneten Solventien erschwert. Das Geschwindigkeitsrate/Druckverhältnis ist nur in erster Näherung linear, bei steigendem Druck nimmt das Reaktionsvolumen und das Aktivierungsvolumen unweigerlich ab. Deshalb sind Untersuchungen bei Drücken über 1 GPa wenig aussagefähig. Die für diese Studien relevanten Vergleichsdaten wurden dementsprechend bei Drücken unter 1 GPa ermittelt, bei Drücken unter 600 MPa ist der lineare Bezug noch hinreichend gegeben.

Mehrstufige Reaktionen komplizieren die Bestimmung des Aktivierungsvolumens für den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Steht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt am Ende einer Reihe von druckempfindlichen Gleichgewichtsreaktionen, dann besteht die beobachtete Volumendifferenz aus der Summe aller Reaktionsvolumina (ΔV°) der vorgeschalteten, schnellen Reaktionen plus dem Aktivierungsvolumen (ΔV^\ddagger) im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Für Additionsreaktionen liegen die Reaktionsvolumina zwischen -20 und -50 ml/mol. Bei zusätzlichen Liganden führen die Austauschprozesse zu weiteren Volumenänderungen, die eine Interpretation der Meßwerte meist unmöglich machen.¹⁹⁷ In dem untersuchten System wird für den [2+2]-Mechanismus ein einziges Intermediat vor der Umlagerung postuliert, das Reaktionsvolumen einer derartigen Addition sollte dann als Summe des Reaktionsvolumens mit dem Aktivierungsvolumen gemessen werden.

Die Hochdruckapparatur am Institut für Organische Chemie erlaubt lediglich den Betrieb bei einem Wert von 600 ± 40 MPa (6 kbar). Es steht keine Möglichkeit für *online* Analyse zur Verfügung, deshalb konnten nur langsam reagierende Substrate untersucht werden.

4-Chlorstyrol, *trans*-Stilben und *trans*-Ethylcinnamat (Bild 87) reagieren hinreichend langsam unter Normaldruck. Für stöchiometrische Ansätze und Konzentrationen für Olefin und Osmiumtetroxid unterhalb von 0,02 mol/l beträgt die Halbwertszeit mehr als 24 h ($\sigma_{1/2} > 1$ d). Dies erlaubt häufige Probennahme und verringert den Fehler durch die adiabatische Erwärmung bei der anfänglichen Druckbelastung. Diese Erwärmung um ca. 20°C klingt gewöhnlich in 20-30 Minuten ab. Bei schnellen Reaktionen, wie für *trans*-Stilben (Bild 88), führt das jedoch zu Reaktionsbeschleunigungen von ca. 10% (Bild 89).

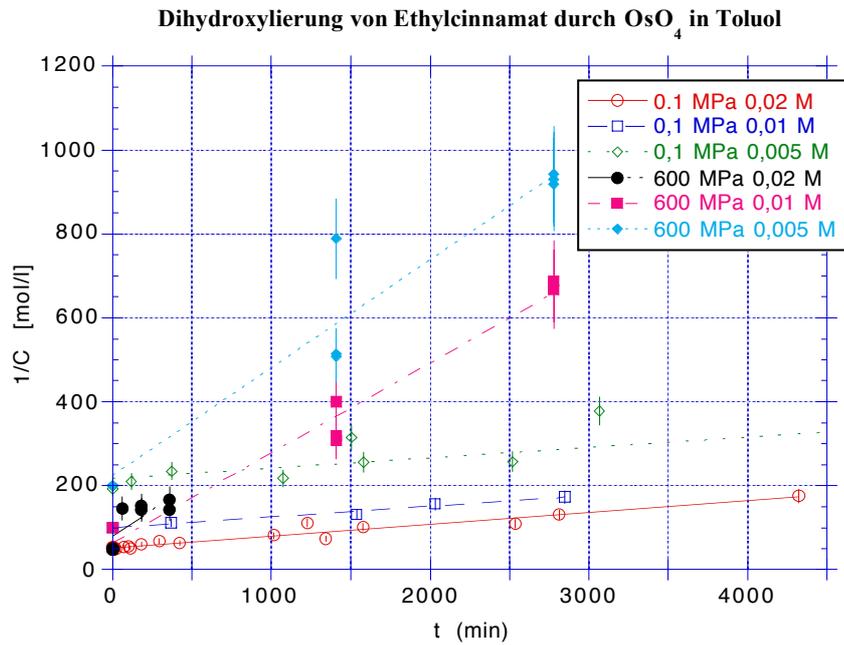


Bild 87 Ethylcinnamat

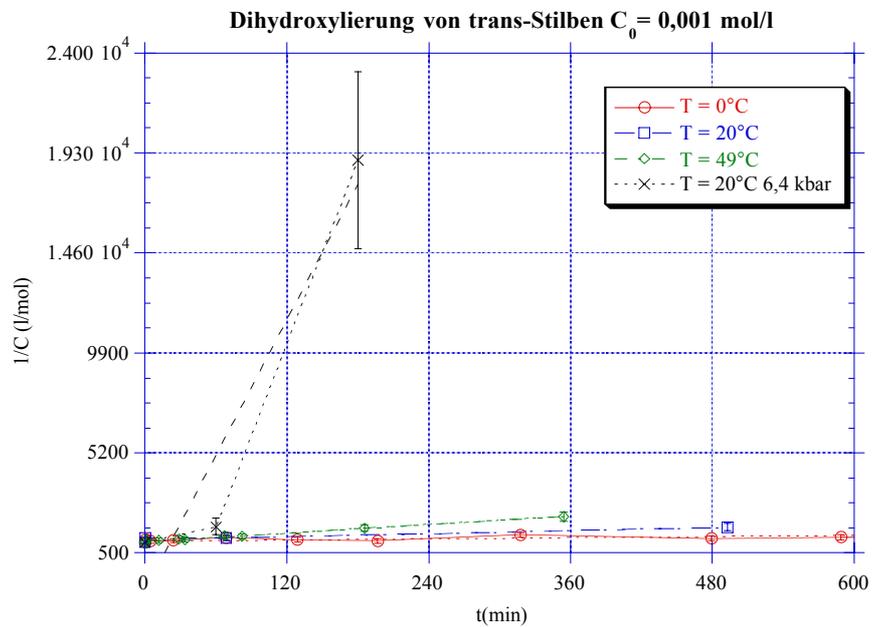


Bild 88 Stilben

Druckvariationen – Es wurden mehrere Sätze von Experimenten bei Normaldruck und verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Die Hochdruckexperimente wurden bei 600 MPa durchgeführt, es wurden stets äquimolare Lösungen von Olefin und Osmiumtetroxid bei verschiedenen Anfangskonzentrationen eingesetzt. Die graphischen Auftragungen von $1/C$ gegen die Zeit sind linear (Bild 87). Die Steigungen der Geraden wurden durch lineare Regressionsanalyse ermittelt (Software: Kaleidagraph, Version 2.1.3) und liefern mit den Anfangskonzentrationen die individuellen Geschwindigkeitskonstanten k (s. Formel 1-3).

Formel 1	Reaktion 2. Ordnung	A + B -> C
Formel 2	$C_{A0} = C_{B0}$	
Formel 3	$k = 1/t * (1/C_A - 1/C_{A0})$	

Es wurden Versuche bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt, um den Fehler durch die adiabatische Kompression zu ermitteln (Bild 6 + 7). Diese Kompression führt zu einem Temperatursprung der Lösung von 20° auf 40°C mit einer 20minütigen Abklingzeit.

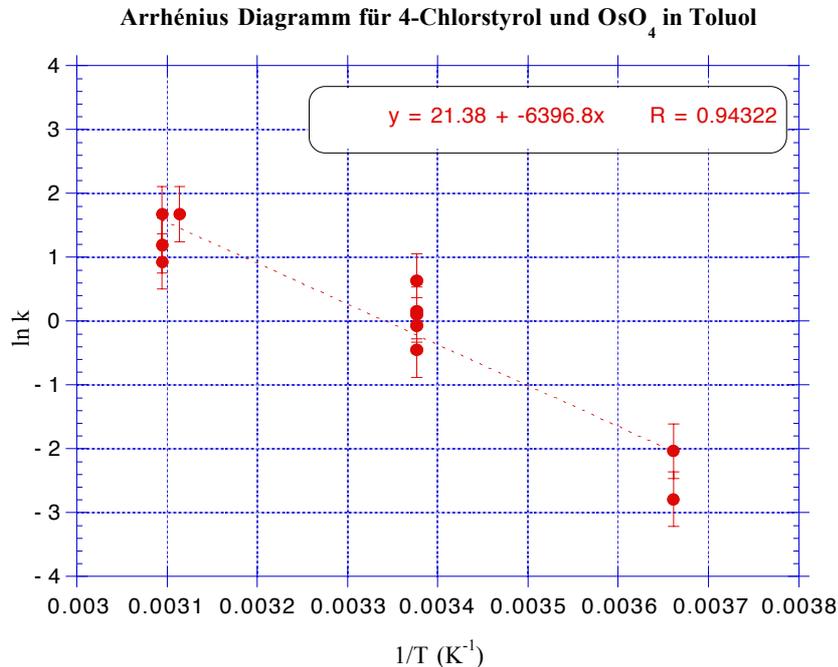
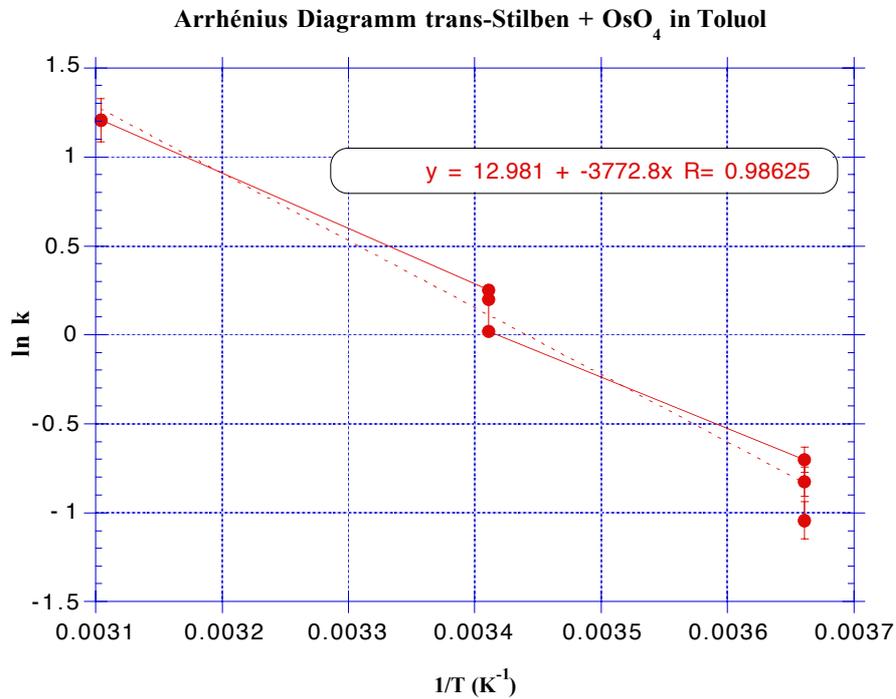


Bild 89

**Bild 90**

Der Beitrag dieser Erwärmung zur Reaktionsgeschwindigkeit liegt bei 1-10% für die untersuchten Substrate, dies in Abhängigkeit von Anfangskonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit. Bei hohen Anfangsgeschwindigkeiten führt das zu einer Abweichung von +10%. Hinzu kommen die experimentellen Fehler durch Volumenmessungen (2%), Integration (5%) und der Druckmessung (3%). Deshalb variieren die Gesamtfehler von 10% (1 bar, C = 0,01 mol/l) bis 22% (600 MPa, C = 0,02 mol/l).

Tabelle 7					
Geschwindigkeitskonstanten der Dihydroxylierung					
Substrate	C	k at 0,1 MPa	corr. coef.	k at 600 MPa	corr. coef.
	[mol/l]	[l/mol*min]		[l/mol*min]	
<i>t</i> -Ethylcinnamat	0,02	0,028 ± 0,003	0,97	0,25 ± 0,04	0,76
<i>t</i> -Ethylcinnamat	0,01	0,026 ± 0,003	0,98	0,21 ± 0,03	0,98
<i>t</i> -Ethylcinnamat	0,01	0,024 ± 0,002	0,84	0,26 ± 0,04	0,94
<i>t</i> -Stilben	0,001	0,429 ± 0,04	0,98	>106 ± 23	0,96
4-Chlorstyrol ^a	0,001	1,080 ± 0,10	0,99	34,2 ± 7,5 ^a	0,96

Alle Reaktionen wurden in Toluol bei 22°C (± 1°C) durchgeführt. a) bei 640 MPa

Die Geschwindigkeitskonstanten bei gleichen Temperaturen und Drücken wurden gemittelt. Die Aktivierungsvolumina wurden anhand der Druckabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit und der Formel 4 berechnet. Die gleichen Meßserien wurden in CHCl₃ durchgeführt, es wurden aber sehr viel größere Streuungen der Meßwerte beobachtet, dementsprechend schlecht ist der Korrelationsgrad der linearen Regression (≈ 0,8). Die Streuung der Meßergebnisse, insbesondere bei langen Reaktionszeiten und hoher Verdünnung, wird auf die bekannte Instabilität von Osmiumtetroxid in Chloroform-Lösungen zurückgeführt. Deshalb sind die Daten für Chloroformlösungen nicht hinreichend gesichert.

Formel 4 $\delta \ln k / \delta P = -\Delta V^\ddagger / RT .$

Daraus ergeben sich die folgenden Aktivierungsvolumina (Tabelle 3):

Tabelle 8		
Aktivierungsvolumina		
	ΔV^\ddagger [ml/mol] in Toluol 22°C	ΔV^\ddagger [ml/mol] in CHCl ₃ 22°C
<i>trans</i> -Stilben	$-18,3 \pm 6 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$	$-9,7 \pm 5 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$
4-Chlorstyrol	$-13,8 \pm 4 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$	$-6,1 \pm 3 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$
<i>trans</i> -Ethylcinnamat	$-9,0 \pm 2 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$	$-5,9 \pm 3 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$

Schlußfolgerung - Die Streuung der beobachteten Aktivierungsvolumina (ΔV^\ddagger), der beträchtliche experimentelle Fehler und die Beschränkung auf wenige, langsam reagierende Substrate und Toluol sowie Chloroform als Solventien limitieren die Daten zu einer qualitativen Aussage. Hinzu kommt die wesentliche apparative Beschränkung auf nur einen Hochdruckmesspunkt, die eine Extrapolation des Aktivierungsvolumens mit großer Unsicherheit versehen. Die gemessenen Aktivierungsvolumina ($\Delta V^\ddagger_{\text{obs}}$) liegen jedoch unterhalb der publizierten Daten für Cycloadditionen, aber im Rahmen metallorganischer Reaktionen (**Tabelle 6**). Der [2+2]-Cycloadditionsmechanismus, wie er in der neueren Form von Sharpless et al. postuliert wird, fordert die Umlagerung des Metallaoxetanes **2** zum Glycolat **5** (Bild 86) als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Diese Umlagerung soll unter Abbau sterischer Spannung¹⁸² verlaufen, daraus folgt ein positives Aktivierungsvolumen, das bei der Messung des Effektes durch das negative Reaktionsvolumen des reversiblen Additionsschrittes überlagert wird. Um die Größenordnung dieses potentiellen Aktivierungsvolumen abzuschätzen, wurden die Untersuchungen der electrocyclischen Ringöffnung gespannter Substrate konsultiert. Derartige konrotatorische Ringöffnungen von Cyclobutenen¹⁹⁶ zeichnen sich durch Aktivierungsvolumina von -7 ml/mol aus. Wird gleichzeitig sterische Spannung abgebaut, werden Werte von -2 ml/mol gemessen. Deshalb sollte das Aktivierungsvolumen (ΔV^\ddagger) der Osmetan-Umlagerung einen Wert von 0 bis 5 ml/mol aufweisen. Das Reaktionsvolumen (ΔV°) der reversiblen [2+2]-Addition sollte im Einklang mit ähnlichen Reaktionen (**Tabelle 6**) zwischen -20 und -35 ml/mol betragen. Ein

System mit diesen Kenndaten wird bei hohem Spannungsaufbau im Primärschritt ($\Delta V^\circ \approx -35$ ml/mol) wegen des hohen positiven Aktivierungsvolumen ($\Delta V^\ddagger \approx 5$ ml/mol) der Umlagerung ein gemessenes Aktivierungsvolumen ($\Delta V_{\text{obs}}^\ddagger$) von -30 ml/mol aufweisen. Bei fehlendem Spannungsaufbau wird ein Grenzwert von -20 ml/mol nicht unterschritten. Daraus folgt die zu beobachtende Volumenänderung für eine derartige Reaktion von $\Delta V_{\text{obs}}^\ddagger = -20$ bis -35 ml/mol. Dieser Wert kann mit den durchgeführten Messungen nicht bestätigt werden. Deshalb wird ein derartiger Mechanismus ausgeschlossen. Eine direkte, geschwindigkeitsbestimmende [2+2]-Cycloaddition, wie sie auch für die Reaktion von Methylrheniumtrioxid mit H_2O_2 beobachtet¹⁹⁸ wurde, ist mit den gemessenen Daten jedoch vereinbar. Der direkte [2+3]-Cycloadditionsmechanismus sollte durch ein Aktivierungsvolumen von -20 bis -40 ml/mol charakterisiert werden, deshalb muß auch dieser Mechanismus ausgeschlossen werden.

Der erhebliche Unterschied der Aktivierungsvolumina der 3 Substrate kann durch Annäherung der Substituenten im Übergangszustand erklärt werden. Die Aufhebung der *trans*-Geometrie und die resultierende sp^3 -ähnliche Hybridisierung eines produktnahen Intermediates führt zum Zusammenschwingen der Substituenten.

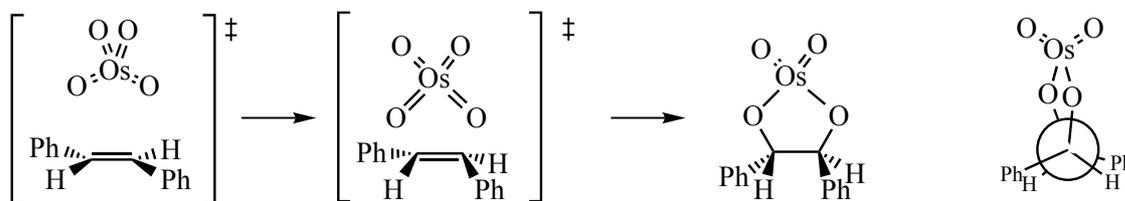


Bild 91

Die gemessenen Werte deuten auf eine Bindungsbildung ($\Delta V^\ddagger \approx -10$ ml/mol)¹⁹⁸ im Übergangszustand hin. Die berechneten Aktivierungsenergien des [2+3]-Mechanismus (**Tabelle 9**) ähneln den gemessenen Aktivierungsenergien (Steigung: 6396,8 J/k* mol) für 4-Chlorstyrol $12,7 \pm 1,3$ kcal ($53,2 \pm 5,3$ kJ/mol).

Die Abweichung der Meßwerte von den Vorhersagen deuten auf Reaktionsintermediate hin, wie sie von Corey et al. für die Erklärung der Michaelis-Menten-Kinetik vorgeschlagen wurden:

- Ligand/Substrat-Komplex, Stabilisierung durch van-der Waals-Interaktionen
- OsO₄/Olefin-Komplex, Stabilisierung durch π -d Interaktion

Mechanismus	Lit.	ΔH [kcal/mol]	ΔE_A [kcal/mol]
[2+3]	198	-15,8	1,9
[2+3]	198	-12,2	9,6
[2+2]	198	-20,6	1,8
[2+2]	198		43,3
[2+2]	198	+11,1	44,7
[2+2]	198	+3,7	39,7

Substrat	ΔE_A [kcal/mol]	[kJ/mol]
4-Chlorstyrol	12,7 ± 1,3	53,2 ± 5,3
<i>trans</i> -Stilben	7,3 ± 0,7	30,7 ± 3,1

Aufgrund der Inversionstemperatur in Eyring-Diagrammen in Gegenwart und Abwesenheit von Pyridin kann der Ligand/Substrat-Komplex ausgeschlossen werden, zumal diese Arbeiten von Sharpless et al. unter unzureichendem Umsatz durchgeführt wurden.¹⁹⁸ Bei

den Maximalumsätzen von 20% ist eine zuverlässige Unterscheidung von Inversionstemperatur und Michaelis-Menten-Kinetik nicht möglich, aber die Unabhängigkeit beider Effekte vom Ligandenzusatz schließen den Ligand/Substrat-Komplex aus.

Für den OsO_4 /Olefin-Komplex können Koordinations- und *Charge-Transfer*-Komplexe diskutiert werden. Die Ladungsübergänge zu *Charge-Transfer* Komplexen zeichnen sich durch ähnliche Aktivierungsvolumina aus, wie sie in dieser Arbeit berichtet werden, ihre Bildung kann aber wegen der beobachteten Michaelis-Menten-Kinetik, der Inversionstemperaturen-unabhängigkeit vom Ligandenzusatz und der bekannten *CT*-Inhibition durch Liganden nicht den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellen. Sie können allenfalls als vorgeschaltete, schnelle Gleichgewichts- oder Nebenreaktion auftreten. Als produktbildende Gleichgewichtsreaktionen sollten sie einen Reaktionsvolumenbeitrag von -5 bis -8 ml/mol aufweisen, dies in Analogie zu dem Tetracyanoethylen *CT*-Komplex mit *trans*-Stilben. Als Nebenreaktion führen sie unter Inhibierung zu entsprechenden Reaktionsvolumenbeiträgen von +5 bis +8 ml/mol.

Unter Berücksichtigung der *CT*-Inhibition durch Liganden verbleibt als plausibles Modell nur der π -d Olefin- OsO_4 -Komplex, der in einem [3+2] ähnlichen Übergangszustand als geschwindigkeitsbestimmender Aktivierungskomplex zu dem Glycolat reagiert.

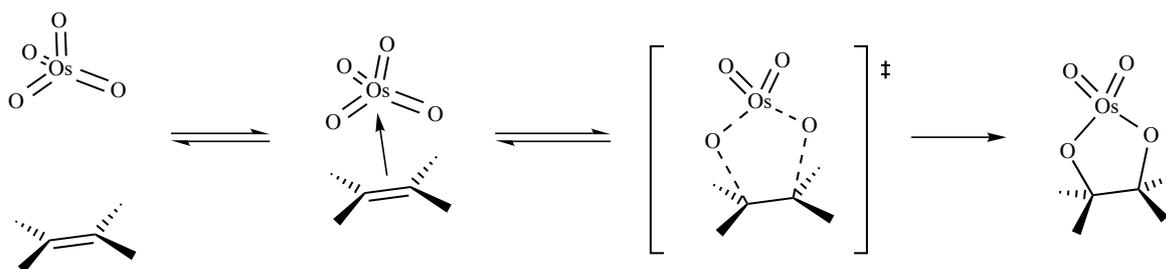


Bild 92

Anwendung: Die 10- bis 250-fache Reaktionsbeschleunigung ist synthetisch nutzbar bei langsam reagierenden Substraten. Wegen der notwendigen, stöchiometrischen Menge an

OsO₄ ist eine Anwendung in der beschriebenen Weise wenig sinnvoll. Zunächst muß noch der Einfluß von Hochdruck auf katalytische Systeme geprüft werden. Ein ähnlicher, wenn auch schwächerer Effekt wird bei der Umsetzung von Osmiumtetroxid und Olefinen unter Ultraschall beobachtet. Der synthetische Nutzen der 10 bis 20fachen Beschleunigung durch Ultraschall soll in weiteren Arbeiten untersucht werden.

Experimente: Alle feuchtigkeits- und sauerstoffempfindlichen Reaktionen wurden in ofengetrockneten und ausgeheizten Glasgeräten unter Stickstoff- oder Argonatmosphäre durchgeführt. Die Lösungsmittel wurden getrocknet, destilliert und unter Schutzgas über Molsieb gelagert. Die Reaktionskontrolle erfolgte durch gas-chromatographische Analyse bei Umsätzen bis 75% gegen interne Standards (Dihydrostilben, Dihydroethylcinnamat und 4-Chlortoluol). Die Hochdruckexperimente wurden bei 600 MPa für 2 bis 48 h und einer Adiabate auf 40°C und anschließender Abkühlung auf 22°C in 20 Minuten durchgeführt. Gas-Chromatographie wurde durchgeführt auf einem Hewlett Packard 5890 Series II GC verbunden mit einem Hewlett Packard 3396 Series II Integrator, einer Macherey & Nagel SE 54 Kapillarsäule und einem FI Detektor. Eine typische 0,21 M Stammlösung an OsO₄ wurde bereitete aus 53,3 mg OsO₄ und 2,10 ml Toluol in einem 5 ml Rundkolben ohne Gummisepten. Die Stammlösungen wurden bei -5°C bis zum Auftreten erster Verfärbungen oder maximal 7 Tage aufbewahrt. 0,1 M Olefinstammlösungen wurden bereitete aus 10,0 mmol Olefin in 100 ml Toluol und internem Standard (4-Chlortoluol, Dihydroethylcinnamat, Dihydrostilben). Ein thermostatisiertes ($\pm 0,5$ K) 2 ml Wheaton-Reaktionsgefäß mit Teflondichtung wurde mit der Olefinstammlösung, einer äquimolaren Menge Osmiumtetroxidlösung und Toluol bis zum Erreichen von 1 ml befüllt und durch Magnetrührer gerührt. Die Proben für die Hochdruckansätze wurden unmittelbar in die Apparatur eingebracht. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 100 µl Proben mit einer gasdichten Spritze entnommen und sofort zu intensiv gerührter 1 M NaHSO₃ (0,1 ml) Lösung gegeben. 1 µl der organischen Phase wurde mittels GC analysiert. Das Verhältnis der integrierten Signale für Olefin und Standard wurde mit dem Anfangsverhältnis verglichen und gegen die Anfangskonzentration normiert.

IV. Synthese chiraler Bipyridyle und ihre Komplexierung

In den letzten 20 Jahren wurden die klassischen Bipyridyl-Komplexe der Übergangsmetalle weiterentwickelt zu supramolekularen Aggregaten.²⁰²⁻²⁰⁹ Die Entwicklung neuartiger, substituierter 2,2'-Bipyridyle ermöglichte gezielten Elektronentransfer und eine erhöhte Lebensdauer der photochemisch angeregten Zustände, sowie die programmierte^{207,210-215} Bildung chiraler Helices. Insbesondere die wegweisenden Arbeiten von J.-M. Lehn führten^{202,210,213,216-220} zu immer neuen Helices und Gitterstrukturen. Die Variation der Pyridyluntereinheiten, der Abstandhalter und der Metalle selbst, führte zu einer großen Zahl an neuen, faszinierenden Strukturen mit neuen photochemischen Eigenschaften. Die optisch aktiven 2,2'-Bipyridyl-Übergangsmetallkomplexe sind von besonderem Interesse für die reversible optische Datenaufzeichnung, aber auch für die enantioselektive organische Synthese. Trotz dieses Potentials in asymmetrischen Reaktionen gibt es nur wenige Arbeiten, die von enantiomerenreinen Komplexen und ihren Eigenschaften berichten. Neuere Arbeiten von S. Sakaki²²¹ beschreiben chirale, Cu(I)-basierte Photosensoren oder die *Super Chiragene*,^{211,212,222-225} die mit diesem Namen von A. von Zelewsky als chirale Einheiten in die Komplexsynthese eingeführt wurden (**Bild 93**).

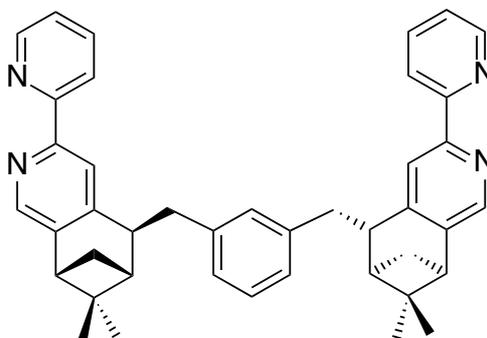


Bild 93 A. von Zelewsky: *Super Chiragen*

Mit dem neuen Konzept: Komplex als Ligand, wurde eine Reihe von 2,2'-Bipyridylen mit zusätzlichen Donorsubstituenten dargestellt,²²⁶ die durch die selektive Koordination zur Bildung sowohl ästhetischer, als auch chemisch interessanter Supramoleküle fähig sind. Diese heteronuklearen Komplexe zeichnen sich durch ihr besonderes Redox-Verhalten und

ihre Photochemie aus. Die bistabilen, helicalen Anordnungen stehen im Zentrum vieler Synthesen, weil sich diese chiralen Helices für den Einsatz als optische Schalter in der Informationstechnologie anbieten.²²⁷ Die Verwendung als optisches Relais basiert auf der Inversion der Helicität durch circular polarisiertes Licht. Zu diesem Zweck müssen die enantiomeren Helices eine hinreichend hohe Aktivierungsbarriere der Inversion gegenüber Temperatur, Streulicht und eine Toleranz gegen Verunreinigungen aufweisen.

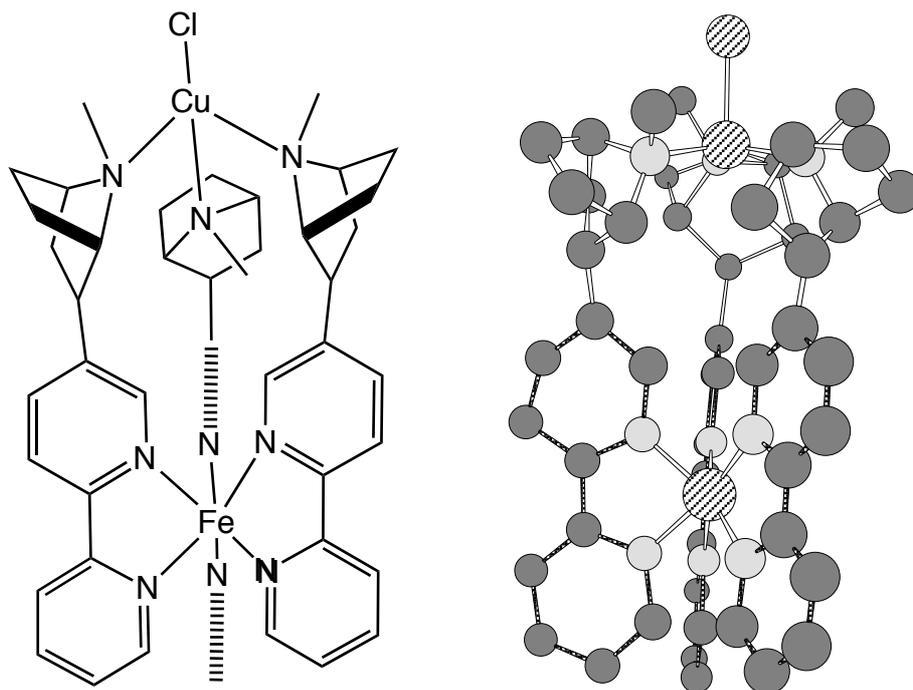
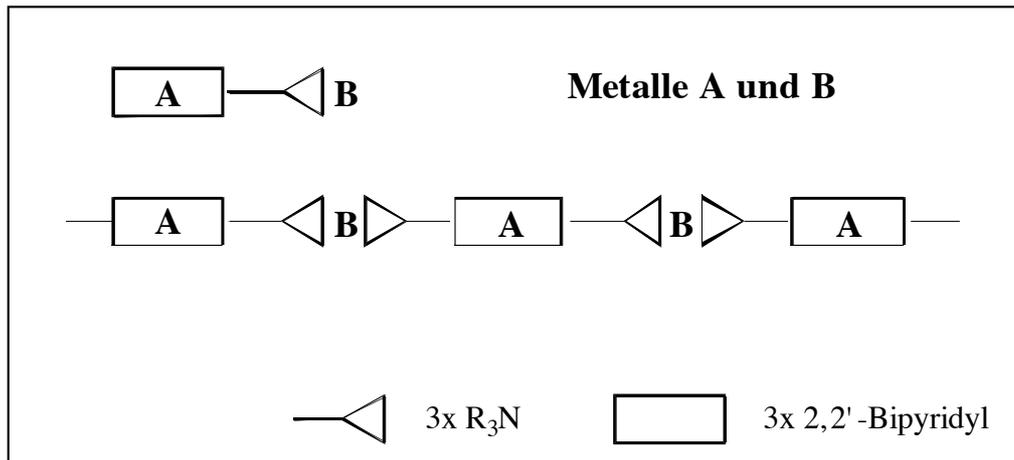


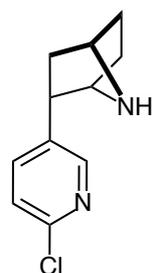
Bild 94 Pyridylepipatidin Fe(II)/Cu(I)-Komplex, Links: ChemDraw Darstellung, Rechts: Computersimulation durch MM2

Diese Arbeit befaßt sich mit der spontanen Bildung chiraler, helicaler Metallkomplexe. Diese dreifach helicalen Komplexe, deren Bipyridyl-Untereinheiten sich von Pyridylalkaloiden wie Nikotin und Epibatidin ableiten (Bild 94, Bild 96), eignen sich wegen der zusätzlichen Koordinationsstelle zur selektiven Bildung heterodinuklearer Komplexe. Sie sind aber auch zur Ausbildung supramolekularer Polymere im Sinne des Bausteinprinzips (Bild 95) fähig.

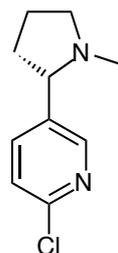
**Bild 95**

Die Helicalität der Komplexe wird hervorgerufen durch die Koordinationsgeometrie des Metalles **A** und des Bipyridins. Oktaederkoordination der Metalle ermöglicht die räumliche Nähe der zusätzlichen Koordinationsstellen und damit die Komplexbildung des Metallkations **B**. Die zweite Koordinationsstelle (Pyrrolidin oder [2.2.1]-Azabicycloheptan) schließt die Bildung meridionaler^{214,228} Isomere aus, da sie die synfaciale Anordnung erzwingt (*frozen propeller*). Möglich ist die Bildung von Diastereomeren, die sich in der Helicalität der Metall-Chelatisierung unterscheiden.

Mit diesem Ziel wurde die Synthese minimaler, jedoch chiraler Liganden geplant, die zusätzliche Aminofunktionen tragen sollten. Überdies sollten gleichzeitig Epibatidin-Analoga synthetisiert werden, da sich die strukturelle Verwandtschaft von Nikotin und Epibatidin in ihrer Affinität zum nikotinergen Acetylcholinrezeptor (nAChR) widerspiegeln.^{150,229-231} Diese geplanten Nikotinderivate befinden sich inzwischen im allgemeinen Rezeptor-*Screening* durch das Hans-Knöll-Institut, Jena, sowie im *Screening* der Bayer AG. Um eine aufwendige Synthese zu vermeiden, wurde 6-Chlornikotin als Ausgangssubstanz für die Liganden gewählt (Bild 96).²³² Diese Substanz ist aus dem Naturstoff in wenigen Stufen zugänglich und liefert das benötigte chirale Zentrum in höchster Enantiomerenreinheit.



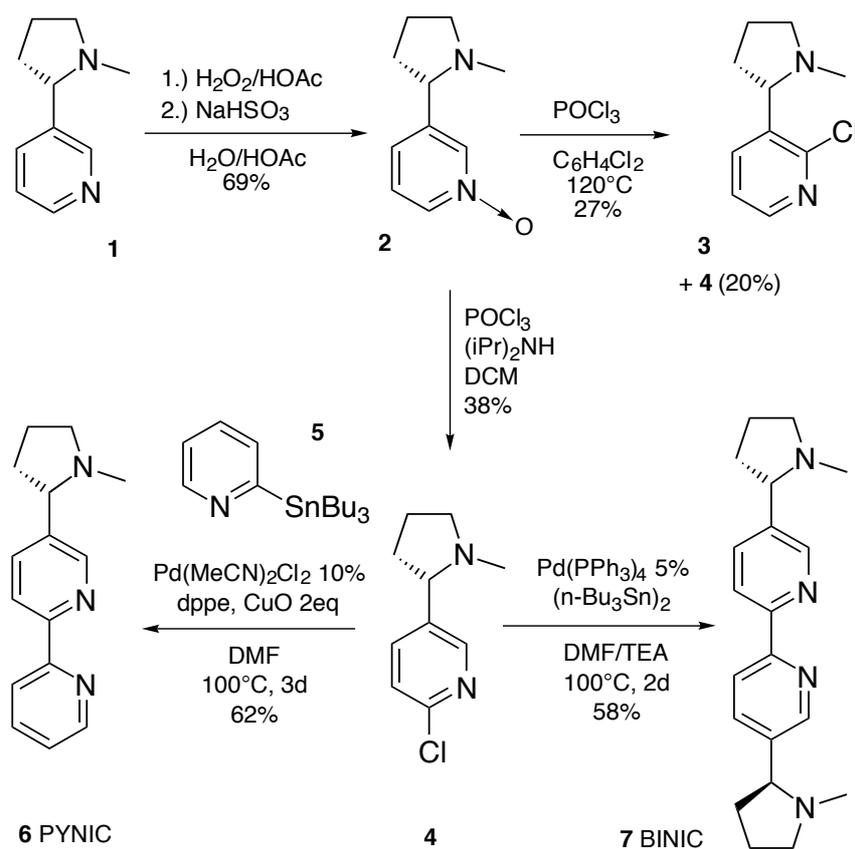
Epibatidin



6-Chlornikotin

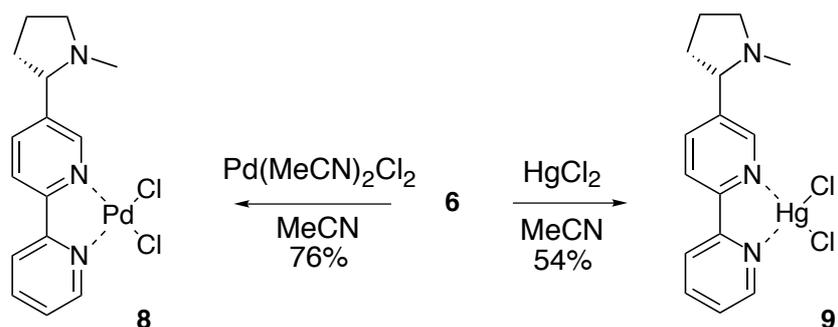
Bild 96

Hierdurch reduzierte sich die synthetische Aufgabe auf die regioselektive Anknüpfung der zweiten 2'-Pyridyl-Einheit zu dem Liganden PYNIC (6). Ausgehend vom gleichen Startmaterial 4 sollte die formale Nikotin-Dimerisierung den C_2 -symmetrischen Liganden BINIC (7) liefern.

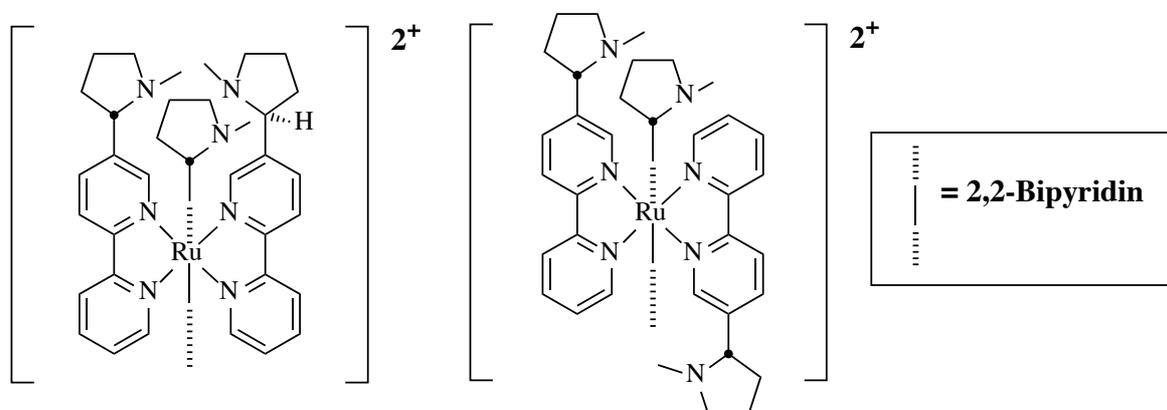
**Bild 97**

Derartige Bipyridylsynthesen aus Halopyridinen und Metallapyridinen durch Palladium-katalysierte Kreuz-Kupplungen sind vielfach beschrieben.²³³⁻²³⁷ (-)-Nikotin wurde durch Wasserstoffperoxid und Eisessig in das Bis-*N*-oxid überführt, die anschließende selektive Reduktion des Pyrrolidin-*N*-oxides mit Natriumhydrogensulfit ergab das gewünschte Pyridyl-*N*-oxid²³⁸ (**2**) in 69% Ausbeute. Das kristalline *N*-Oxid wurde bei Raumtemperatur mit 10 Äquivalenten Phosphoroxychlorid umgesetzt, dies führte zur Bildung der isomeren Chlornikotine **3** (27%) und **4** (20%). Die Bildung des unerwünschten Isomeren **3** läßt sich jedoch durch die Zugabe von 3,4 Äquivalenten an Diisopropylamin bis an die Grenze der Nachweisbarkeit (<1%) unterdrücken,²³⁵ dabei wird die Ausbeute an **4** auf 38% gesteigert. Diisopropylamin kann in dieser Reaktion nicht durch andere sekundäre Amine wie Piperidin oder Pyrrolidin ersetzt werden, der sterische Anspruch des Diisopropylamines scheint hierbei ausschlaggebend für den Reaktionserfolg zu sein. Die Bildung des gespannteren Isomeren **3** wird durch den dirigierenden Effekt des Pyrrolidin-Stickstoffes erklärt. Eine nicht näher definierte Ammoniumphosphoroxyspezies hält durch elektrostatische Wechselwirkungen das Chlorid bereit, das die Boekelheide Reaktion^{236,239} an der 2-Position ausführt. Der Wettbewerb der zugefügten sekundären Amine um das Phosphoroxychlorid begünstigt die Reaktion an der leichter zugänglichen 6-Position. Palladium-katalysierte Kreuz-Kupplung des Chloronikotines **4** und des 2-(Tributylstannyl)pyridines²⁴⁰ **5** ergab das 2,2'-Bipyridin (**6**, PYNIC) in 52 % Ausbeute. Kupferzusatz führt zu einer Ausbeuteverbesserung auf 62%. Um eine Palladium(II)-katalysierte Razemisierung der benzylichen Position auszuschließen, wurden die stöchiometrischen Salze mit D(-)- und L(+)-Weinsäure durch ¹H NMR Spektroskopie in MeOH-D₄ untersucht. Der Enantiomerenüberschuß beträgt mindestens 90%, eine genauere Angabe ist wegen der Basislinienauflösung nicht möglich.

Die formale Nikotindimerisierung wurde durch die Umsetzung von **4** mit Hexabutyldizinn und Tetrakispladium erreicht. Im Gegensatz zur PYNIC-Synthese ließ sich die Ausbeute an BINIC (**7**) nicht durch Kupferzusatz steigern. Eine Razemisierung der benzylichen Position blieb ebenfalls aus. Ein spezieller Nachweis mußte nicht geführt werden, da die Razemisierung zu einer diastomeren *meso*-Verbindung Anlaß geben würde, die aber nicht beobachtet wurde.

**Bild 98**

Der blass-gelbe Palladiumdichloridkomplex wurde durch die Reaktion stöchiometrischer Mengen an PdCl_2 und PYNIC in Acetonitril erhalten. Nach 2-facher Kristallisation konnte der Komplex in 76% Ausbeute isoliert werden. Das Maximum der UV-Absorption des freien Liganden wird durch die Palladium-Komplexierung von 242 nm ($\lg \epsilon = 5,458$) nach 308 und 303 nm ($\lg \epsilon = 6,151, 6,090$) verschoben.²⁴¹ Der analoge, nahezu farblose Quecksilberdichlorid-Komplex wurde durch die gleiche Methode erhalten, jedoch in schlechterer Ausbeute (54%).

**Bild 99**

Da sich bei oktaedrischer Koordination von PYNIC an Ru(II) nicht nur die beiden erwarteten diastereomeren Helices sondern auch noch die meridionalen Isomere (**Bild 7**) bilden, konnten bis jetzt keine einheitlichen Substanzen isoliert werden. Die direkte

Komplexierung der Pyrrolidin-Stickstoffe sollte eine synfaciale Anordnung der Substituenten erzwingen, war aber bislang nicht erfolgreich. Deshalb wurden die Komplexierungsversuche mit BINIC fortgesetzt, das aufgrund seiner C₂-Symmetrie weniger Isomere ausbilden kann. Da bislang kein kristallines Material isoliert werden konnte, wurden die Komplexierungen durch NMR-Spektroskopie verfolgt. Eine genaue Zuordnung der Helicalität der untersuchten Komplexe steht noch aus.

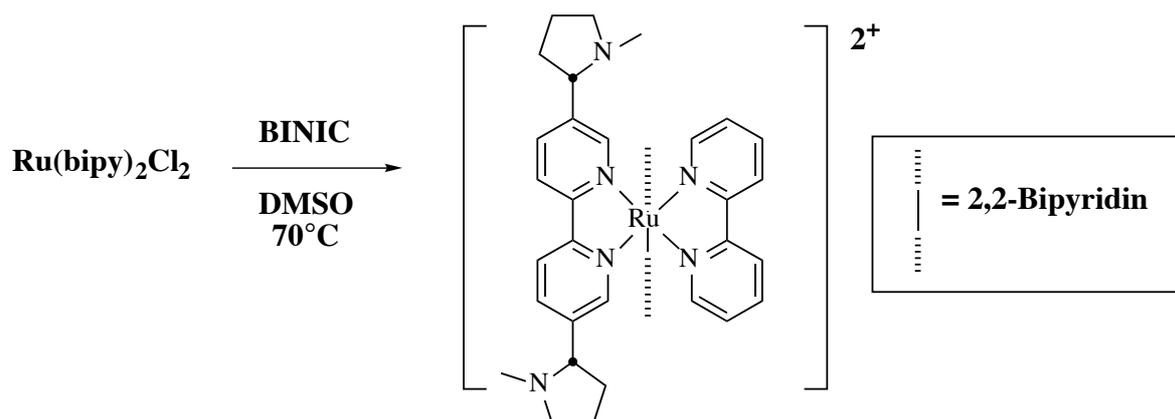
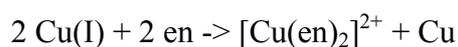


Bild 100

Die interessanteren Cu(I)-Komplexe von BINIC und PYNIC sind bislang nicht darstellbar. Sowohl BINIC als auch PYNIC induzieren die Disproportionierung von Cu(I) zu Cu und Cu(II) analog zur Ethylendiamin (en) induzierten Reaktion.



Da für *gemini*-Tenside die Bildung von Nanotubes anstelle von gewöhnlichen Micellen vorhergesagt wurde,^{242,243} könnten sie ideale Grundgerüste für Metall-Bipyridylkomplexe darstellen. Durch Variation des lipophilen Substituenten der Alkylglycoside und der Konfiguration des anomeren Zentrums sollte sich die Bildung von Micellen, *Nanotubes* und Langmuir-Blodget-Filmen beeinflussen lassen. Derartige unilamellare Filme von Rhodium-2,2'-Bipyridinkomplexen zeichnen sich durch besonders hohe Selektivität bei der Reduktion von Ketonen aus.²⁴⁴ Ähnliche Konzepte wurde für die Photosynthese von Wasserstoff entwickelt, die experimentellen Ergebnisse waren jedoch nicht reproduzierbar.^{245,246}

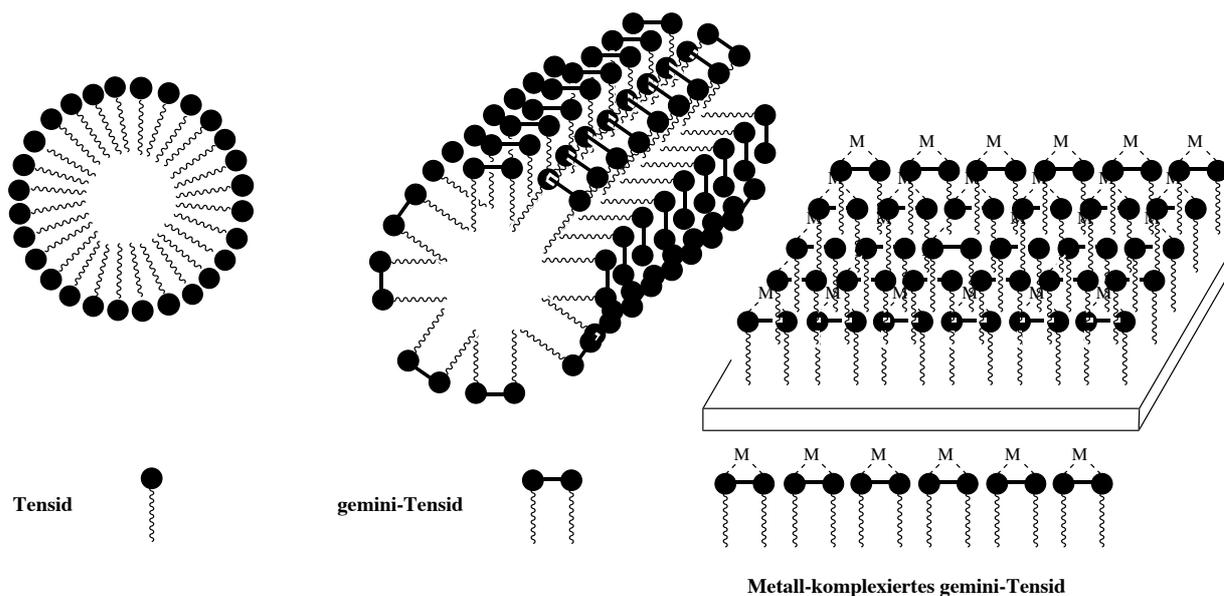


Bild 101

Die hochgeordneten Strukturen der Bipyridyl-*gemini*-Tensidenseite ermöglichen durch die Bereitstellung von 2,2'-Bipyridyleinheiten in definierten Oberflächen eine kontrollierte Beeinflussung der Katalyseaktivität. Die Systeme sind im Grenzbereich zwischen homo- und heterogener Katalyse angesiedelt. Mit diesem Ziel wurde die Synthese des Bipyridyl-*gemini*-Glycosides **6** begonnen.

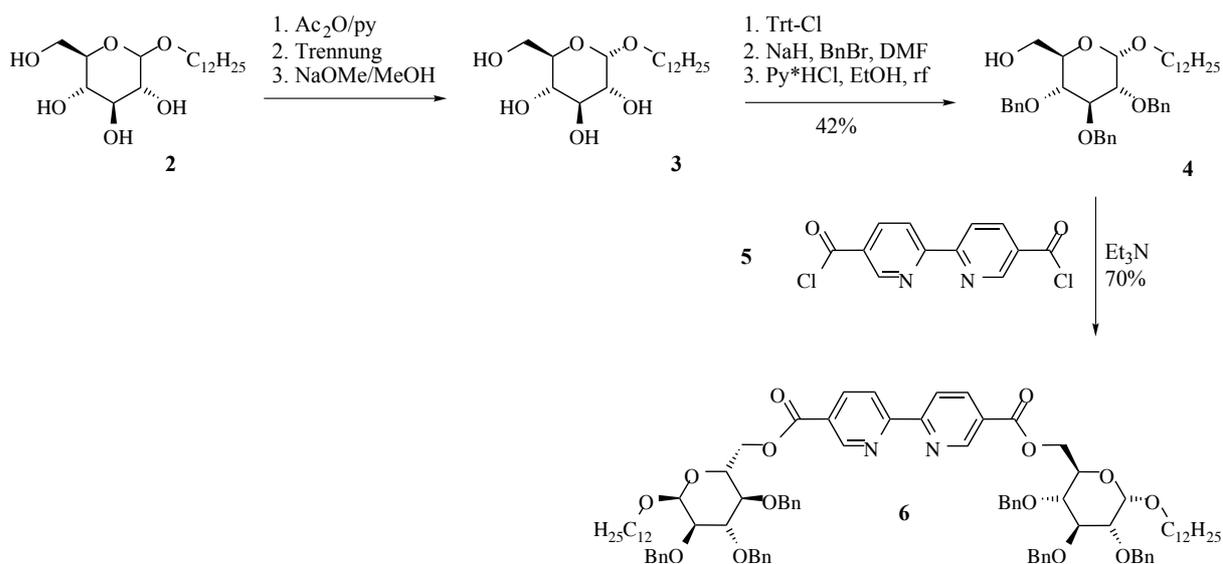


Bild 102

Dieses Pilot-Glycosid soll durch reduktive Entschützung und Komplexierung zu den entsprechenden Komplexen **7** + **8** und supramolekularen Strukturen umgesetzt werden.

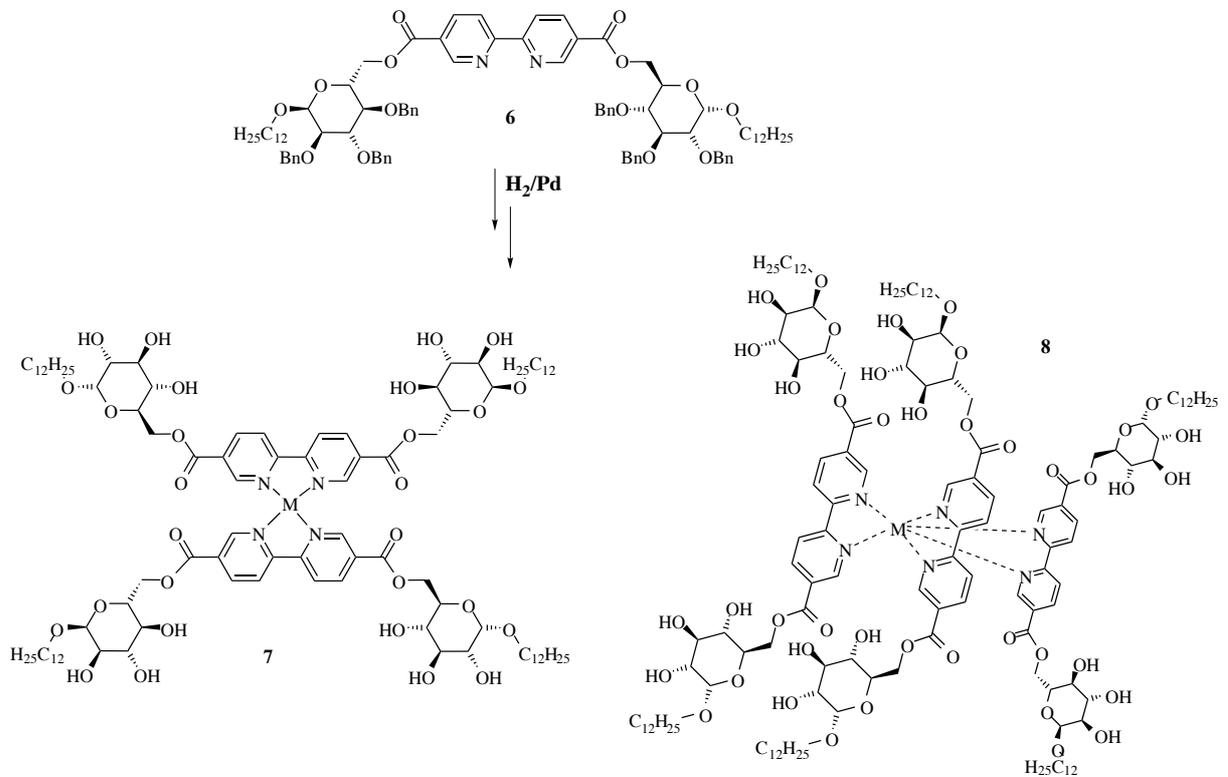


Bild 103

Zusammenfassung

Durch Palladium-katalysierte Kreuz-Kupplung sind die chiralen Bipyridin-Liganden BINIC und PYNIC zugänglich. Die Kondensation einer Bipyridindicarbonsäure mit der 6-Position eines geschützten α -D-Dodecylglycosides ermöglicht den Zugang zu oberflächenaktiven Bipyridylkomplexen.

V. Experimenteller Teil

Die Experimente, die dieser Arbeit zu Grunde liegen, sind anteilig erbracht worden von:

Dipl.-Chem. Christian Kühn, Dipl.-Chem. Dennis K. Ehlert, Dipl.-Chem. Vera Neitemeier, Greta Patzke, Dr. Gunnar Lindeberg (Universität Uppsala), Susanna Lindman (Universität Uppsala) und Muriel Nicholas. Sie wurden finanziert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SCHM 1012/2), den Personenbezogenen Projektaustausch mit der Universität Uppsala durch den DAAD/SI, die Henkel KGaA und das Hans-Knöll-Institut.

Die Experimente sind dokumentiert durch die Diplomarbeit von Vera Neitemeier, Universität Hannover 1996, und der Dissertation von Christian Kühn, Universität Hannover 1998. Sie wurden außerdem veröffentlicht in den folgenden Arbeiten:

1. Schmidt, B.; Lindman, S.; Tong, W.; Lindeberg, G.; Gogoll, A.; Lai, Z.; Thörnwall, M.; Synnergren, B.; Nilsson, A.; Welch, C. J.; Sohtell, M.; Westerlund, C.; Nyberg, F.; Karlén, A.; Hallberg, A. Design, Synthesis and Biological Activities of Four Angiotensin II Receptor Ligands with γ -Turn Mimetics Replacing Amino Acid Residues 3-5. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 903-919.
2. Schmidt, B.; Neitemeier V. 6-Pyridylnicotine - A New Chiral 2,2-Bipyridine. *Synthesis* **1998**, 42-44.
3. Kühn, C.; Lindeberg, G.; Gogoll, A.; Hallberg, A.; Schmidt, B.; Fmoc Protected Peptide Mimetic Based on a Cyclohexane Framework and Incorporation into Angiotensin II. *Tetrahedron* **1997**, 53, 12497-12504.
4. Schmidt, B., Ehlert D. K. Preparation of N-Boc-(2,6-bis(ethoxycarbonyl-pyridinyl)-alanines as Tridentate Ligands. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 3999-4002.

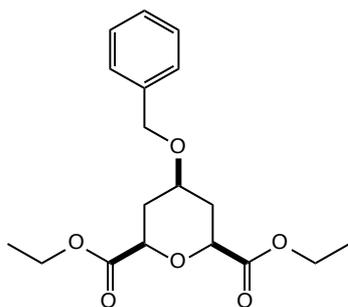
Sie wurden auf 4 Konferenzen vorgestellt:

1. Juni 1997 16. Organika Dagarna, Uppsala, Schweden
2. September 1997 GDCh-Tagung, Wien
3. 17.3.1998 Dozententagung Essen
4. 28.3.1998 WEB-Tagung München

Chemie. Allgemeine Anmerkungen. Schmelzpunkte (unkorrigiert): offene Glaskapillaren, Büchi Apparat – ^1H and ^{13}C NMR Spektren: Bruker WP 200, Bruker AM 400, JEOL JNM-EX 270, Varian Unity 400 Spektrometer bei 200 (50.3) MHz, 270 (67.8) MHz und 400 (100.58) MHz. Die *Chemischen Verschiebungen* werden als δ Werte (ppm) tieffeld zu Me_4Si angegeben – IR spectra: Perkin Elmer 1710 FT, 1600 FT und Bruker IFS 25, angegeben als $\nu_{\text{max.}}$ (cm^{-1}). Massenspektrometrie: *Applied Biosystems BIOION 20 plasma desorption mass spectrometer*, Finnigan MAT 312, VG Autospec (FAB, HRMS). PDMS-Proben wurden durch Trocknung aus EtOH/ H_2O /TFA-Lösungen auf Aluminiumbedampfte Mylarfolien aufgebracht, die durch Elektrospray mit Nitrocellulose beschichtet wurden. Elementar Analyse: Elementar Vario EL. Säulenchromatographie: Merck und Baker Kieselgel 60 (40-63 μm und 15-40 μm), Et_2O (Diethylether), EE (Ethylacetat) PE (Leichtpetroleum, Sdp. 40-60°C). Dünnschichtchromatographie (TLC) wurde durchgeführt mit Kieselgel 60-beschichteten Aluminiumkarten F₂₅₄ (0.2 mm, E. Merck). Die Verbindungen wurden nachgewiesen durch UV und/oder Anfärben mit einer sauren, ethanolischen Lösung von *p*-Anisaldehyd, oder einer ethanolischen Lösung von Ninhydrin, sowie Erhitzen. Analytische und preparative HPLC/MPLC wurde durchgeführt auf einer Merck-Hitachi L-6250, ausgestattet mit einem variablen Wellenlängendetektor L-4000, RP18 4 x 250 5 μm LiChrocart[®] und 218TP1010 VYDAC (10 μm , 10 x 250). Aminosäurenanalyse und Peptidgehalt wurden bestimmt durch Dr. M. Sundquist an 24 h Hydrolysaten mit einem LKB 4151 *alpha plus analyser* mit Ninhydrindetektion. *Materialien*: SPPS-Harze, Aminosäurederivate z.B. Fmoc-His(Boc)-OH*CHA, Fmoc-Arg(Pmc)OH, Fmoc-Asp(O^tBu)OH, Fmoc-Tyr(O^tBu)OH und Kondensationsreagenzien (PyBroP[®]) stammen

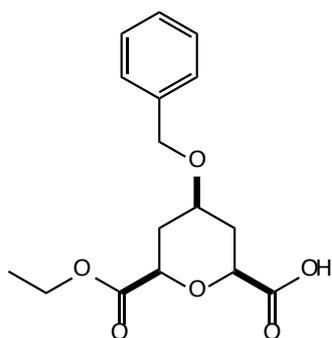
von Fluka Chemie (Schweiz), NovaBiochem (Schweiz), Millipore und Bachem (Schweiz). S-Trt-mercaptoethylamin wurde entsprechend der Literatur dargestellt.²⁴⁷ DCM, DMSO, CHCl₃ und DMF wurden getrocknet, destilliert und über 3 Å Molsieb gelagert. Organische Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet.

Spektroskopische Daten unveröffentlichter Verbindungen



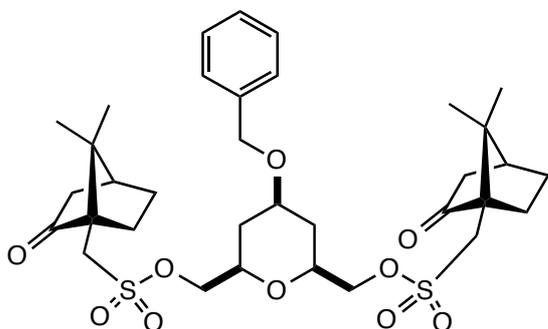
All-cis-2,6-Bis(ethoxycarbonyl)-4-benzyloxytetrahydropyran

¹H NMR 400 MHz CDCl₃ 1,3 (t, ³J=7,2, 6H, CH₃), 1,60 (dd, ³J = 12,2, ³J = 12,7, 2 H, 3), 2,43 (dm, ²J = 24, 2 H, 3_B), 3,69-3,75 (m, 1H, 4), 4,01 (dd, ³J = 12,7, ³J = 2, 2H, 2), 4,25 (q, ³J = 7,2, 4 H, CH₂CH₃), 4,61 (s, 2H, PhCH₂), 7,17-7,38 (m, 5H_{arom}). ¹³C NMR 100,6 MHz DEPT, CDCl₃ 14,12 (q, Me), 34,47 (t, 3), 61,63 (t, PhCH₂), 69,90 (t, CH₂C H₃), 73,34+74,72 (2x d, 2, 4), 127,55+127,83 + 128,53 (5x d, 5C_{arom}), 137,92 (s), 169,86 (s, 2x CO₂Et). IR CHCl₃ 2984m, 1732s, 1530m, 1192m; MS (70eV): *m/z* (%): 230(10), 202 (5), 91 (100). C₁₈H₂₄O₆ FG.: 336,39.



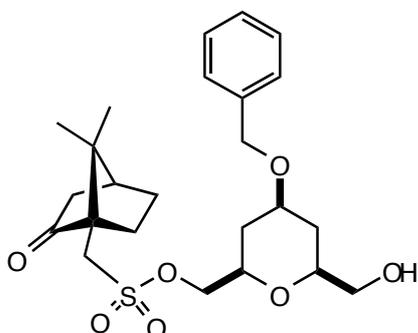
(2S,4R,6R/2R,4S,6S)-4-Benzyloxy-6-ethoxycarbonyltetrahydropyran-2-carbonsäure ¹H NMR 200 MHz CDCl₃ 1,27 (t, J = 7, 3 H, CH₃), 2,35 (q, J = 12, 2 H, 3_B), 2,3-2,7 (2x bm,

2 H, 3a), 3,6-3,8 (m, 1 H, 4), 3,95-4,1 (q, J = 7 H, 2 H, OCH₂CH₃), 4,6 (dd, J = 13,5, J = 10,8, 2H, PhCH₂O), 7,2-7,4 (m, 5 Harom.), C₁₆H₂₀O₆ FG.: 308,3342



(2*S*,6*R*)-2,6-Di-((1*S*)-(+)-campher-10-sulfonyloxy-methyl)-4-benzyloxy-tetrahydropyran

¹H NMR 400 MHz, CDCl₃ 0,94 (s, 6H, CH₃), 1,36 (s, 6H, CH₃), 1,28-1,55 (m, 4H), 1,67-1,77 (m, 2H), 2,00 (dd, ²J = 18,6, J = 2,2, 2H), 2,06-2,2 (m, 6H), 2,38-2,55 (m, 4H), 3,11 (dd, ²J = 15,8, J = 1,6, 2H), 3,65-3,80 (m, 5H), 4,28-4,36 (m, 4H), 4,63 (s, 2H, PhCH₂O), 7,2-7,45 (m, 5H) ¹³C NMR 100,6 MHz CDCl₃ BB 19,68 (Me), 24,91 (Me), 26,83, 26,85, 33,50, 42,48, 42,80, 47,03, 47,96, 58,00, 69,85, 71,69, 73,37, 76,76, 127,58, 127,76, 128,50, 138,08, 214,49 (C=O). FAB 681 (M⁺, 12%), 574 (M⁺-C₇H₇O, 3%), C₃₄H₄₈S₂O₁₀, FG.: 680,88.

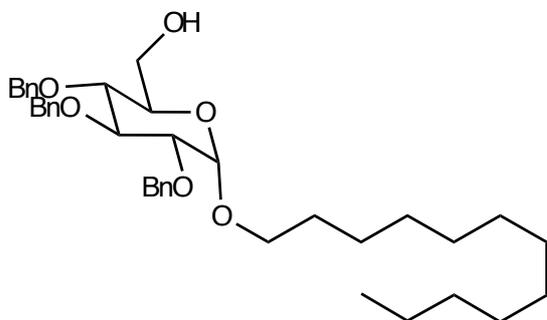


(2*S*,6*R*)-2-((1*S*)-(+)-Campher-10-sulfonyloxy-methyl)-4-benzyloxy-tetrahydropyran

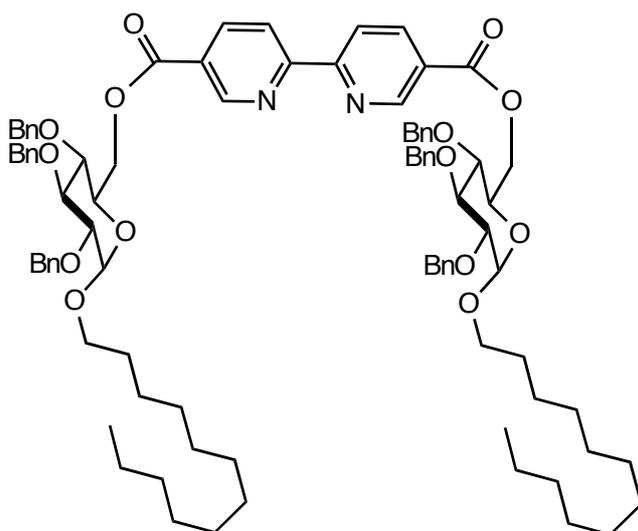
¹H NMR 400 MHz, CDCl₃ 0,89 (s, 3H, Me), 1,13 (s, 3H, Me), 1,2-1,5 (m, 3H), 1,6-1,7 (m, 1H), 1,9-2,2 (m, 6H), 2,3-2,6 (m, 2H), 3,07 (dd, J = 15,3, J = 2,4, 1H), 3,45-3,75 (m, 5H), 3,73 (dd, J = 15,3, J = 2,2, 1H), 4,27-4,33 (m, 2H), 4,58 (s, 2H, PhCH₂), 7,3-7,45 (m, 5H) ¹³C NMR 100,6 MHz CDCl₃ BB 19,67+19,86 (Me), 24,97, 26,81, 33,44, 33,59, 42,53, 42,90, 47,42, 47,92, 58,18, 65,72, 69,78, 72,17, 73,38, 73,82, 76,60, 127,58, 128,48, 138,27,

140,69, 215,27 (C=O). IR 3592m, 3524m, 1744s, 1360s (SO₂O), 1172s (SO₂O), 980s.

$[\alpha_D]^{25^\circ\text{C}} = 24,0 \pm 0,2$ (C = 1,00 \pm 0,02 CHCl₃).



1-Dodecyl-2,3,4-tribenzyl- α -D-glycosid ¹H NMR 400 MHz CDCl₃, 0,88 (t, J=7,2, 2H, Me), 1,2-1,4 (m, 18H), 1,55-1,7 (m, 2H), 3,35-3,42 (m, 1H), 3,35-3,42 (m, 1H), 3,48 (dd, J= 9,6, J=3,6, 1H), 3,53 (d, J=9,2, 1H), 3,55-3,63 (m, 1H), 3,65-3,78 (m, 3H), 4,02 (t, J=9,3, 1H-5), 4,62-4,71 (m, 3H), 4,78 (d, ²J= 12,1, 1H, PhCH), 4,83 (d, ²J= 10,8, 1H, PhCH), 4,88 (d, ²J= 11, 1H, PhCH), 5,01 (d, ²J= 10,8, 1H, PhCH), 7,2-7,4 (m, 15 Harom.)
¹³C NMR 100 MHz, CDCl₃ DEPT 14,1 (q, 12'), 22,7+26,2+29,39+29,41+29,5+ 29,6+ 29,63+29,68+29,7 (9 x t, 3'-11'), 31,9 (t, 2'), 61,9 (t, 6), 68,3 (t, 1'), 70,7 (d), 73,2+75,1+ 75,7 (3x t, PhCH₂), 80,2 (d), 82,0 (d), 96,8 (d, 1), 127,0-128,0 (9x d, 15 Carom.), 138,2+138,4+139,0 (3x s, 3 Carom.). IR CHCl₃ 2928s, 2856s, 1496m, 1452m, 1366m, 156m, 1068s, 1028s. C₃₈H₅₄O₆ F.G.: 606,85 Elementaranalyse ber.:C 75,21 H 8,97 O 15,82, gef.:C 75,34 H 8,97.



Bis[6-*O*-(2,3,4-tribenzyl-*n*-dodecyl- α -D-glucopyranosid)]-2,2'-bipyridyl-4,4'-dicarboxylat

$^1\text{H NMR}$ 400 MHz CDCl_3 0,87 (t, $J = 6,8$, 6H, 12'), 1,15-1,4 (m, 36H, CH_2 , 3'-11'), 1,55-1,70 (m, 4H, 2'), 3,38-3,46 (m, 2H), 3,53-3,62 (m, 4H), 3,63-3,70 (m, 2H), 3,98-4,05 (m, 2H, 6), 4,08 (t, $J = 11$, 2H), 4,49 (dd, $J = 5,1$, $^2J = 9,7$, 2H,), 4,58 (dd, $J = 1,8$, $2J = 9,7$, 2H), 4,65 (d, $2J = 10,9$, 2H, 1''a), 4,67 (d, $^2J = 12,0$, 2H, 1''a), 4,75 (d, $J = 3,7$, 2H, 1), 4,80 (d, $^2J = 12,0$, 2H, 1''b), 4,85 (d, $^2J = 10,7$, 2H, 1''a), 4,95 (d, $^2J = 10,9$, 2H, 1''b), 5,04 (d, $^2J = 10,7$, 2H, 1''b), 7,2-7,5 (m, 30 Harom.), 7,80 (dd, $^3J = 5$, $^4J = 1,6$, 2H-5), 8,81 (d, $^3J = 5$, 2H-6), 8,93 (d, $^4J = 1,6$, 2H-3). $^{13}\text{C NMR}$ 100,6 MHz DEPT, CDCl_3 14,1 (q, 12'), 22,7+26,2+29,37+29,39+29,43+29,47+29,50+29,58+ 29,68 (9 x t, 3'-11'), 31,9 (t, 2'), 64,5 (t, 6), 68,4 (t, 1'), 68,6 (d), 73,2+75,1+75,9 (3x t, PhCH_2), 80,3 (d), 82,2 (d), 96,7 (d, 1), 120,6+123,1 (2x d, 2x 5''', 2x 6'''), 127,8+127,9+127,99+128,0+128,1+128,2+128,48+ 128,49+ 128,54 (9x d, 15 Carom.), 137,8+138,3+138,6 (3x s, 3 Carom.), 150,0+156,5 (2x s, 2x 1''', 2x 4'''), 164,8 (s, 2x CO_2). IR CHCl_3 2928s, 1732s, 1452m, 1372m, 1284m, 12522, 1044s. $\text{C}_{88}\text{H}_{112}\text{O}_{14}\text{N}_2$ FG.: 1421,879

***N*-Acetyl-*N*-allylglycin** *N*-Allylglycin²⁴⁸ (715 mg, 5.0 mmol) wurde mit Acetanhydrid (0.65 ml, 6.88 mmol) in Pyridin (5 mL) über 3 h bei 0°C umgesetzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgezogen, der Rückstand wurde mit NaOH (0,6 g, 15 mmol) in Dioxan/Wasser (15 mL, 10:1) behandelt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgezogen und der Rückstand mit 2 N HCl behandelt, bis der pH-Wert 3 betrug. Die wässrige Phase wurde mit EE extrahiert (3x 40 mL). Die getrockneten und konzentrierten organischen

Phasen wurden aus CHCl_3/PE 1:2 zu farblosen Prismen umkristallisiert (560 mg, 71 %), Smp. 73 °C. $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{N}$, FG.: 157,17. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25°C, TMS) 2,17 (s, 3H), 4,00 (d, $^3\text{J} = 2,8$, 2H, 1'), 4,12 (s, 2H $_{\alpha}$), 5,12-5,30 (m, 2H), 5,68-5,86 (m, 1H, 2'). ^{13}C NMR (100,6 MHz, CDCl_3 , 25°C, TMS) 20,77, 47,16, 55,21, 117,8, 131,8, 171,7, 172,48 (CON); IR (CHCl_3) $\nu = 3000\text{bs}$, 1742vs, 1648vs, 1472m, 1420m. MS (70 eV): m/z (%) 157 (7, M^+), 114 (100), HRMS: ber. 157,0738861, gef. 157,073685. CHN-Analyse: ber. C 53,49, H 7,05, N 8,91, gef. C 53,44, H 6,98, N 8,86.

N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-N-allylglycin *N*-Allylglycin*HCl²⁴⁹ (455 mg, 3,00 mmol) wurde in 0,9 N Na_2CO_3 -Lösung (8 mL) und Dioxan (4,5 mL) aufgelöst. Die Lösung wurde auf 0°C gekühlt und mit Fmoc-Succinimid (1,012 g, 3,00 mmol) über 2 h versetzt. Nach 24 h wurden 100 ml Wasser zugefügt und die Mischung mit Et_2O (2x 35 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wurde auf pH 3 durch conc. HCl eingestellt und mit EE (3x 100 ml) extrahiert. Die vereinigten, getrockneten Extrakte wurden im Vakuum konzentriert. Man erhält Fmoc-N-AllGly als a farbloses Öl (810 mg, 80%), $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_4$, FG.: 337,38. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25°C, TMS) 3,85 (s, 1H), 3,97 (m, 2H; 1'), 4,04 (s, 1H), 4,24 (dt, $^3\text{J} = 6,9$, 1H), 4,46 (d, $^3\text{J} = 6,9$, 2H; OCH_2), 5,14 (m, 2H, 3'), 5,72 (m, 1H), 7,1-7,8 (m, 8H). ^{13}C NMR (100,6 MHz, CDCl_3 , 25°C, TMS) 31,74, 47,2, 50,75, 76,17, 117,75, 118,3, 119,97, 124,84, 127,79, 132,84, 141,33, 144,29, 155,92, 156,51. IR (CHCl_3) $\nu = 1728\text{s}$, 1700vs, 1236s, 1120s. MS (70 eV): m/z (%): 337 (1,4, M^+), 297 (1,2), 178 (100). CHN-Analyse: ber.. H 5,68 C 71,2 N 4,15, gef. H 5,59 C 71,0, N 4,02.

N-Fmoc-N-allylglycylphenylalaninmethylester. $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5$, FG.: 498,58. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25°C, TMS) 1,83 (dm, 2H; CH_2Ph), 3,06 (m, 2H; CH_2CHCH_2), 3,20 (m, 1H; $\text{H}_{\alpha\text{Phe}}$), 3,65 (s, 3H; OCH_3), 3,79 (s, 2H; $\text{H}_{\alpha\text{Gly}}$), 3,87 (s, 1H; NH), 4,13 - 4,22 (m, 1H; CH_2CHCH_2), 4,40 - 4,49 (m, 2H, CH_2CHCH_2), 7,00 - 7,80 (m, 13H). IR (CHCl_3) $\nu = 2932\text{m}$, 1740s, 1688s, 1516m, 1244s; MS (70 eV): m/z (%): 461 (3,2) , 449 (2,0), 178 (100). CHN-Analyse: ber.. C 72,27, H 6,06, N 5,62, gef. C 71,92, H 6,21, N 5,86.

***N*-Allylglycyl-phenylalaninmethylester** C₁₅H₂₀N₂O₃, FG.: 276,34. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃, 25°C, TMS) 1,55 (s, 1H), 2,95 - 3,25 (m, 6H), 3,65 (s, 3H; OCH₃), 4,80 (m, 1H; H_αPhe), 4,90 - 5,15 (m, 1H; CH₂CHCH₂), 5,60 - 5,80 (m, 2H; CH₂), 6,95 - 7,30 (m, 5H_{arom}), 7,55 (s, 1H; NH); IR (CHCl₃): ν = 3000 m, 1744s, 1672s, 1516m, 1236w; MS (70 eV): *m/z* (%): 276 (40), 244 (11).

(*S*)-1-Benzyl-3-allyl-2,5-diketopiperazin C₁₄H₁₆N₂O₂, FG.: 244,2 ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, 25°C, TMS) 3.02 (m, 2H), 3,11 (ddd, ³J = 4,4, 2H; CH₂Ph), 3,71 - 3,96 (m, 2H; 1'), 4,31 (dd, ³J = 4,4, 1H; C1-CH), 5,08 - 5,18 (m, 2H; 3'), 5,53 - 5,65 (m, 1H; 2'), 7,12 - 7,32 (m, 5 H_{arom}); IR (CHCl₃) ν = 3392w, 3008m, 1664vs, 1452m, 1224s; MS (70 eV): *m/z* (%): 244 (39), 230 (4,3), 204 (5,6), 154 (47), 91 (100).

(*S*)-1-Methyl-3-allyl-2,5-diketopiperazin C₈H₁₂O₂N₂, FG.: 168,197. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C, TMS) 1,51 (d, ³J = 6,5, 3H; CH₃), 3,92 (s, 2H; α_{Gly}), 4,02 - 4,03 (m, 2H; 1'), 4,11 (q, ³J = 6,5, 1H; α_{Ala}), 5,20 - 5,31 (m, 2H; 3'), 5,68 - 5,80 (m, 1H; 2'); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25°C, TMS) 19,95, 48,66, 49,07, 50,99(1'), 119,32 (3'), 131,03 (2'), 166,42 (C=O), 166,67 (C=O); IR (CHCl₃): ν = 3396w, 3008m, 1688vs, 1668s, 1448m, 1316m; MS (70 eV): *m/z* (%): 167 (16), 152 (5,2), 126 (11).

***N*-Acetyl-*N*-allylglycyl-*N*-allylglycylphenylalaninmethylester**

C₂₂H₂₉N₃O₅, FG: 415.49, ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, 25°C, TMS) 2,12 (s, 3H; CH₃), 2,88 - 3,15 (m, 1H), 3,13 - 3,25 (m, 1H), 3,67 - 3,73 (d, 3H; OCH₃), 3,80 - 4,18 (m, 8H), 4,25 (d, 2H), 4,67 - 4,78 (m, 1H_α), 5,05 - 5,25 (m, 4H; 2× CH₂CHCH₂), 5,60 - 5,93 (m, 1H; CH₂CHCH₂), 7,17 - 7,33 (m, 5 H_{arom}); IR (CHCl₃): ν = 3000m, 2936m, 1744s, 1664vs, 1436m, 1248m; MS (70 eV): *m/z* (%): 415 (8,6, M⁺), 400 (2,3), 372 (25), 356 (2,3), 329 (2,3).

Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS). Die Peptide wurden durch manuelle SPPS mit Fmoc geschützten Aminosäuren dargestellt: Fmoc-His(Boc)-OH*CHA, Fmoc-Arg(Pmc)OH, Fmoc-Asp(O^tBu)OH und Fmoc-Tyr(O^tBu)OH. Das Harz war beladener Fmoc-Phe-Wang-Polymer. Die Kupplungen wurden durchgeführt wie publiziert.¹⁰³

Aspargyl-arginyl-(N-allyl)glycyl-tyrosyl-(N-allyl)glycyl-histidyl-prolyl-phenylalanin wurde erhalten wie Aspargyl-arginyl-(N-2-mercaptoethyl)glycyl-tyrosyl-(N-2-mercaptoethyl)glycyl-histidyl-prolyl-phenylalanin durch Austausch von S-Trt-Mercaptoethylamin durch Allylamin.

3,5-cyclo-[Aspargyl-arginyl-(N-2-mercaptoethyl)glycyl-tyrosyl-(N-2-mercaptoethyl)glycyl-histidyl-prolyl-phenylalanin]. Fmoc-His(Boc)-Pro-Phe-Wang-Harz (122,1 mg, 68,6 µmol) wurde in DMF (2,0 ml) suspendiert, entschützt durch 20 % (v/v) Piperidin-DMF Lösung (3x 5 ml) und mit DMF (6x 5 ml) gewaschen. Das Harz wurde in einer Lösung von α -Bromessigsäure (114,4 mg, 824 µmol) und Diisopropylcarbodiimid (DIC, 112,5 mg, 832 µmol) in DMF (0,5 ml) suspendiert (3x) und jeweils 30 min geschüttelt. Nach dem Waschen mit DMF (6x 5 ml) wurde eine Lösung von S-Trt-Mercaptoethylamin (328,7 mg, 15 eq) in DMF (0,8 ml) zugefügt. Die Lösung wurde 16 h geschüttelt, mit DMF (6x 5 ml) gewaschen und mit Fmoc-Tyr(O^tBu)OH (157,6 mg, 343 µmol), PyBroP[®] (160 mg, 343 µmol) und DIEA (88,6 mg, 686 µmol) in DMF (1 ml) über 16 h gekuppelt. Das Harz wurde anschließend mit DMF (3 x 5 mL) gewaschen und freie Amine durch 10 % (V/V) Ac₂O-DMF Lösung und DIEA (53,2 mg, 412 µmol) in 15 min acetyliert. Die weitere Synthese des vollständigen Peptides erfolgte nach der generellen, publizierten Methode mit Ausnahme einer zweiten α -Bromessigsäure/S-Trt-Mercaptoethylamin/PyBroP-Sequenz. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte durch TFA-TESH-H₂O (90/5/5) (2 ml) über 2 h. Fällung und Zentrifugation aus kaltem Et₂O ergab das Rohpeptid, das 3x in Et₂O suspendiert und zentrifugiert wurde. Die oxidative Cyclisierung wurde durch DMSO/TFA in 21 h erreicht, gefolgt von wiederholter Etherfällung. Das getrocknete Peptid wurde auf einer 218TP1010 VYDAC Säule (10 µm, 1 x 25 cm, 0,1 % TFA/H₂O, MeCN Gradient 10-50 %)

gereinigt und anschließend lyophilisiert. Man erhält ein farbloses, amorphes Pulver. PDMS: 1067,1 (M⁺+2), Aminosäureanalyse: Arg: 1,01, Asp: 1,00, His: 0,99, Pro: 1,09, Tyr: 0,89, Peptidgehalt: 72,4 %.

Pharmakologische Tests. Bindungsstudien wurden durchgeführt von Susanna Lindmann an transgenen *Chinese Hamster Ovary Cells* (CHO), die den AT₁-Rezeptor exprimieren. Die Zellen wurden in Flaschen auf RPMI Medium mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) gezogen. Die Zellen wurden 1x mit *Hank's Balanced Salt* Lösung (HBSS) gewaschen, zentrifugiert, in Pufferlösung resuspendiert und in *96 well plates* überführt. Die Bindungsstudien wurden durchgeführt über 1 h bei RT mit [¹²⁵I]Ang II und variablen Peptidmengen in HBSS. Die Zellen wurden gewaschen, abzentrifugiert und durch einen α -Zähler ausgewertet. Alle Tests wurden im Doppel durchgeführt und durch GraFit 3.0 (SoftWindows) analysiert.

Literaturliste

- (1) Jakubke, H.-D. *Peptide: Chemie und Biologie*; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 1996.
- (2) Xie, P.; Zhou, Q.; Diem, M. Conformational Studies of β -Turns in Cyclic Peptides by Vibrational CD. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9502-9508.
- (3) Gante, J. Peptidmimetica - maßgeschneiderte Enzyminhibitoren. *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1780-1802.
- (4) Schiller, P. W. Rational Design of Peptidomimetics: Structural and Pharmacological Aspects. In *Medicinal Chemistry for the 21st Century*; C. G. Wermuth, N. Koga, H. König and B. W. Metcalf, Ed.; Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1994; S. 215-232.
- (5) Hirschmann, R. Die Medizinische Chemie im Goldenen Zeitalter der Biologie: Lehren aus der Steroid- und Peptidforschung. *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1305-1330.
- (6) Giannis, A.; Kolter, T. Peptidmimetica für Rezeptorliganden - Entdeckung, Entwicklung und medizinische Perspektiven. *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1303-1326.
- (7) Chorev, M.; Goodman, M. A Dozen Years of Retro-Inverso Peptidomimetics. *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 266-273.
- (8) Pettit, G. R.; Srirangam, J. K.; Herald, D. H.; Hamel, E. The Dolastatins. 21. Synthesis, X-Ray Crystal Structure, and Molecular Modeling of (6*R*)-Isodolastatin 10. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6127-6130.
- (9) Kreil, G. Conversion of L- to D-Amino Acids: A Posttranslational Reaction. *Science* **1994**, *266*, 996-997.
- (10) Searle, M. S.; Williams, D. H. The Cost of Conformational Order: Entropy Changes in Molecular Associations. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10690-10697.
- (11) Hruby, V. J.; Nikiforovich, G. V. The Ramachandran Plot and Beyond: Conformational and Topographical Considerations in the Design of Peptides and Proteins. In *Molecular Conformation and Biological Interaction*; P. Balaram and S. Ramaseshan, Ed.; Indian Academy of Sciences: Bangalore, 1991; S. 429-445.
- (12) Rizo, J.; Dhingra, M. M.; Gierasch, L. M. Peptide Models for Reverse Turns. The Role of Asparagine in the *i* Position of a β Turn. In *Molecular Conformation and Biological Interaction*; P. Balaram and S. Ramaseshan, Ed.; Indian Academy of Sciences: Bangalore, 1991; S. 467-496.
- (13) Thornton, J. M. Protein Structures: The End Point of the Folding Pathway. In *Protein Folding*; T. E. Creighton, Ed.; W. H. Freeman: New York, 1992; S. 59-81.
- (14) Dobson, C.; Sali, A.; Karplus, M. Proteinfaltung aus theoretischer und experimenteller Sicht. *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 909-935.
- (15) Woody, R. W. Circular Dichroism of Peptides. In *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Conformation in Biology and Drug Design*; V. J. Hruby, Ed.; Academic Press: Orlando, 1985; Vol. 7; S. 15-114.
- (16) Ribera-Baeza, C.; Kaljuste, K.; Undén, A. Backbone-to-backbone cyclized and linear pseudopeptide analogs of substance P as ligands to the substance P receptor from rat brain. *Neuropeptides* **1996**, *30*, 327-333.

- (17) Kaljuste, K.; Undén, A. A new general solid-phase method for the synthesis of backbone-to-backbone cyclized peptides. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *43*, 505-511.
- (18) Tao, J.; Hoffman, R. V. A Stereocontrolled, Convergent Synthesis of Hydroxyethylene Dipeptide Isomers. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6240-6244.
- (19) Han, H.; Janda, K. D. Azatides: Solution and Liquid Phase Synthesis of a New Peptidomimetic. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2539-2544.
- (20) Hoffmann, R. V.; Kim, H.-O. The Stereoselective Synthesis of 2-Alkyl γ -Keto Acid and Heterocyclic Ketomethylene Peptide Isostere Core Units Using Chiral Alkylation by 2-Triflyloxy Esters. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5107-5113.
- (21) Hinterding, K.; Alonso-Diaz, D.; Waldmann, H. Organische Synthese und biologische Signaltransduktion. *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 717-780.
- (22) Krauss, G. *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*; Wiley-VCH: Weinheim, 1997, S. 496.
- (23) Marks, F. *Protein Phosphorylation*; VCH: Weinheim, 1996, S. 381.
- (24) Lee, E.-S.; Jurayj, J.; Cusham, M. Synthesis of [L-3-Deoxymimosine⁴]-Angiotensin I as an Approach to the Preparation of Selective Protein-tyrosine Kinase (PTK) Inhibitors. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 9873-9882.
- (25) Andrews, D. M.; Gregoriou, M.; Page, T. C. M.; Peach, J. M.; Pratt, A. J. Potential Mechanism-Based Tyrosine Kinase Inhibitors. Part 2. Design and Synthesis of Peptides Containing Heterocyclic Tyrosine Analogues. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1995**, 1335-1340.
- (26) Jensen, A. J. PhD Thesis, Uppsala Universitet, 1998.
- (27) Bohacek, R.; De Lombaert, S.; McMartin, C.; Priestle, J.; Grütter, M. Three-Dimensional Models of ACE and NEP Inhibitors and Their Use in the Design of Potent Dual ACE/NEP Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8231-8249.
- (28) McN. Sieburth, S.; Nittoli, T.; Mutahi, A. M.; Guo, L. Silandiole: eine neue Klasse potenter Protease-Inhibitoren. *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 845-847.
- (29) Ikeda, Y.; Schultz, L. W.; Clardy, J.; Schreiber, S. L. Structural Basis for Peptidomimicry by a Natural Product. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4143-4144.
- (30) O'Neill, I. A.; Miller, N. D.; Barkley, J. V.; Low, C. M. R.; Kalindjian, S. B. Homochiral Proline N-Oxides as Conformational Constraints in Peptide Like Molecules. *Synlett* **1995**, 619-621.
- (31) Callahan, J. F.; Schiller, P. W.; Lemieux, C.; Huffman, W. F. Design and synthesis of a conformational mimetic of β -turn secondary structure. In *Peptides: Chemistry, Structure and Biology*; R. S. Hodges and J. A. Smith, Ed.; ESCOM: Leiden, 1993; Vol. XIII; S. 290-292.
- (32) Geyer, A.; Müller, G.; Kessler, H. Conformational Analysis of a Cyclic RGD Peptide Containing a Ψ [CH₂-NH] Bond: A Positional Shift in Backbone Structure Caused by a Single Dipeptide Mimetic. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7735-7743.
- (33) Graf von Roedern, E.; Kessler, H. A Sugar Amino Acid as a Novel Peptidomimetic. *Angew. Chem. I.E.E.* **1994**, *33*, 687-689.
- (34) Haque, T. S.; Little, J. C.; Gellman, S. H. "Mirror Image" Reverse Turns Promote β -Hairpin Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4105-4106.
- (35) Hirschmann, R.; Nicolaou, K. C.; Pietranico, S.; Salvino, J.; Leahy, E. M.; Sprengeler, P. A.; Furst, G.; Smith III, A. B.; Strader, C. D.; Cascieri, M. A.;

- Candelore, M. R.; Donaldson, C.; Vale, W.; Maechler, L. Nonpeptidal Peptidomimetics with a β -D-Glucose Scaffolding. A Partial Somatostatin Agonist Bearing a Close Structural Relationship to a Potent, Selective Substance P Antagonist. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9217-9218.
- (36) Hirschmann, R.; Nicolaou, K. C.; Pietranico, S.; Leahy, E. M.; Salvino, J.; Arison, B.; Cichy, M. A.; Spoons, P. G.; Shakespeare, W. C.; Sprengeler, P. A.; Hamley, P.; Smith III, A. B.; Reisine, T.; Raynor, K.; Maechler, L.; Donaldson, C.; Vale, W.; Freidinger, R. M.; Cascieri, M. R.; Strader, C. D. De Novo Design and Synthesis of Somatostatin Non-Peptide Peptidomimetics Utilizing β -D-Glucose as a Novel Scaffolding. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12550-12568.
- (37) Kessler, H.; Matter, H.; Geyer, A.; Diehl, H.-J.; Köck, M.; Kurz, G.; Opperdoes, F. R.; Callens, M.; Wierenga, R. K. Selektive Inhibierung der trypanosomalen Triosephosphat-Isomerase durch ein Thiopeptid. *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 343-345.
- (38) Müller, G.; Gurrath, M.; Kessler, H.; Timpl, R. "Dynamischer Zwang", eine Hilfe für das Verständnis der Aktivität und Selektivität von RGD(Arg-Gly-Asp)-Peptiden. *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 341-343.
- (39) Nachman, R. J.; Tilly, J. W.; Hayes, T. K.; Holman, G. M.; Beier, R. C. Pseudopeptide Mimetic Analogs of Insect Neuropeptides. In *Natural and Engineered Pest Management Agents* ACS Symp. Ser.: 1994; Vol. 551; S. 210-229.
- (40) Toniolo, C.; Formaggio, F.; Crisma, M.; Valle, G.; Boesten, W. H. J.; Schoemaker, H. E.; Kamphuis, J.; Temussi, P. A.; Becker, E. L.; Précigoux, G. Bioactive and Model Peptides Characterized by the Helicogenic (α Me)Phe Residue. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3641-3653.
- (41) Lombart, H.-G.; Lubell, W. D. Synthesis of Enantiopure α,ω -Diamino Dicarboxylates and Azabicycloalkane Amino Acids by Claisen Condensation of α -[N-(Phenylfluorenyl)amino] Dicarboxylates. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6147-6149.
- (42) Rajashankar, K. R.; Ramakumar, S.; Mal, T. K.; Chauhan, V. S. Synthese, Kristall- und Molekülstruktur von Boc-Pro- Δ Phe-ALa- Δ Phe-Ala-OMe, einem Pentapeptid mit ungewöhnlicher β -Turn-Bandstruktur. *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1048-1050.
- (43) Schopfer, U.; Stahl, M.; Brandl, T.; Hoffmann, R. W. Konformationsdesign eines voll flexiblen β II-Hairpin-Analogons. *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1805-1807.
- (44) Virgilio, A. A.; Ellman, J. A. Simultaneous Solid-Phase Synthesis of β -Turn Mimetics Incorporating Side-Chain Functionality. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11580-11581.
- (45) Virgilio, A. A.; Bray, A. A.; Zhang, W.; Trinh, L.; Snyder, M.; Morrissey, M.; Ellmann, J. A. Synthesis and Evaluation of a Library of Peptidomimetics Based Upon the β -Turn. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 6635-6644.
- (46) Raiden, S.; Giordano, M.; Andonegui, G.; Trevani, A. S.; López, D. H.; Nahmod, V.; Geffner, J. R. Losartan, a Selective Inhibitor of Subtype AT1 receptors for Angiotensin II, Inhibits the Binding of N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine to Neutral Receptors. *J. Pharm. Exp. Ther.* **1997**, *281*, 624-628.
- (47) Miller, S. J.; Grubbs, R. H. Synthesis of Conformationally Restricted Amino Acids and Peptides Employing Olefin Metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5855-5856.

- (48) Miller, S. J.; Blackwell, H. E.; Grubbs, R. H. Application of Ring-Closing Metathesis to the Synthesis of Rigidified Amino Acids and Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9606-9614.
- (49) Callahan, J. F.; Bates, J. W.; Burgess, J. L.; Eggleston, D. S.; Hwang, S. M.; Kopple, K. D.; Koster, P. F.; Nichols, A.; Peishoff, C. E.; Samanen, J. M.; Vasko, J. A.; Wong, A.; Huffman, W. F. Design and Synthesis of a C₇ Mimetic for the Predicted γ -Turn Conformation Found in Several Constrained RGD Antagonists. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3970-3972.
- (50) Huffman, W. F.; Callahan, J. F.; Codd, E. E.; Eggleston, D. S.; Lemieux, C.; Newlander, K. A.; Schiller, P. W.; Takata, D. T.; Walker, R. F. Mimics of Secondary Structural Elements of Peptides and Proteins. In *Synthetic Peptides: Approaches to Biological Problems*; J. Tam and E. T. Kaiser, Ed.; AR. Liss: New York, 1989; S. 257-266.
- (51) Mammi, N. J.; Hassan, M.; Goodman, M. Conformational Analysis of a Cyclic Enkephalin Analogue by ¹H NMR and Computer Simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4008-4013.
- (52) Newlander, K. A.; Callahan, J. F.; Moore, M. L.; Thomaszek Jr., T. A.; Huffman, W. F. A Novel Constrained Reduced-Amide Inhibitor of HIV-1 Protease Derived from the Sequential Incorporation of γ -Turn Mimetics into a Model Substrate. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2321-2331.
- (53) Ragg, E.; Mondelli, R.; Penco, S.; Bolis, G.; Baumer, L.; Guaragna, A. Tertiary Structure of Endothelin-1 in Water by ¹H NMR and Molecular Dynamics Studies. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II* **1994**, 1317-1326.
- (54) Graf von Roedern, E.; Lohof, E.; Hessler, G.; Hoffmann, M.; Kessler, H. Synthesis and Conformational Analysis of Linear and Cyclic Peptides Containing Sugar Amino Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10156-10167.
- (55) Burgess, K.; Ho, K.-H.; Pettitt, B. M. Conformational Effects of Substituting Methionine with (2S,3S)-2,3-Methanomethionine in Phe-Met-Arg-Phe-NH₂. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 54-65.
- (56) Martin, S. F.; Dorsey, G. O.; Gane, T.; Hillier, M. C.; Kessler, H.; Baur, M.; Mathä, B.; Erickson, J. W.; Bhat, T. N.; Munshi, S.; Gulnik, S. V.; Topol, I. A. Cyclopropane-Derived Peptidomimetics. Design, Synthesis Evaluation, and Structure of Novel HIV-1 Protease Inhibitors. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1581-1597.
- (57) Curran, T. P.; Chandler, N. M.; Kennedy, R. J.; Keaney, M. T. N- α -Benzoyl-Cis-4-Amino-L-Proline: A γ -Turn Mimetic. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1933-1936.
- (58) Brickmann, K.; Somfai, P.; Kihlberg, J. An Approach to Enantiomerically Pure Inverse γ -Turn Mimetics for Use in Solid-phase Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3651-3654.
- (59) Olson, G. L.; Cheung, H.-C.; Chiang, E.; Madison, V. S.; Sepinwall, J.; Vincent, G. P.; Winokur, A.; Gary, K. A. Peptide Mimetics of Thyrotropin-Releasing Hormone Based on a Cyclohexane Framework: Design, Synthesis, and Cognition-Enhancing Properties. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2866-2879.
- (60) Huffman, W. F.; Callahan, J. F.; Codd, E. E.; Eggleston, D. S.; Lemieux, C.; Newlander, K. A.; Schiller, P. W.; Takata, D. T. Mimics of Secondary Structural Elements of Peptides and Proteins in "Synthetic Peptides": Approaches to Biological Problems.

- In *UCLA Colloquium on Molecular and Cellular Biology*; R. F. Walker, J. P. Tam and E. T. Kaiser, Ed.; Alan R. Liss, Inc.: New York, 1989; Vol. 86; S. 257-266.
- (61) Huffman, W. F.; Callahan, J. F.; Eggleston, D. S.; Newlander, K. A.; Takata, D. T.; Codd, E. E.; Walker, R. F.; Schiller, P. W.; Lemieux, C.; Wire, W. S.; Burks, T. F. Reverse Turn Mimetics. In *Peptides: Chemistry and Biology: Proceedings of the Tenth American Peptide Symposium*; G. R. Marshall, Ed.; ESCOM: Leiden, 1988; S. 105-108.
- (62) Burgess, K.; Ho, K.-K.; Moye-Sherman, D. Asymmetric Syntheses of 2,3-Methanoamino Acids. *Synlett* **1994**, 575-583.
- (63) Burgess, K.; Ho, K.-H.; Pal, B. Comparison of the Effects of (2*S*,3*S*)-2,3-Methanomethionine, (2*R*,3*R*)-2,3-Methanomethionine, and (2*R*,3*R*)-2,3-Methanophenylalanine on the Conformations of Small Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3808-3819.
- (64) Hoog, S. S.; Zhao, B.; Winborne, E.; Fisher, S.; Green, D. W.; DesJarlais, R. L.; Newlander, K. A.; Callahan, J. F.; Moore, M. L.; Huffman, W. F.; Abdel-Meguid, S. S. A Check on Rational Drug Design: Crystal Structure of a Complex of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease with a Novel γ -Turn Mimetic Inhibitor. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3246-3252.
- (65) Giannis, A.; Rüksam, F. Integrin antagonistien und andere niedermolekulare Verbindungen als Inhibitoren der Angiogenese - neue Wirkstoffe in der Tumortherapie. *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 606-609.
- (66) Nicolaou, K. C.; Trujillo, J. I.; Chibale, K. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Carbohydrate Mimetics of cRGDFV. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 8751-8778.
- (67) Callahan, J. F.; Newlander, K. A.; Burgess, J. L.; Eggleston, D. S.; Nichols, A.; Wong, A.; Huffman, W. F. The Use of γ -Turn Mimetics to Define Peptide Secondary Structure. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3479-3488.
- (68) Ferreira, S. H. *Brit. J. Pharmacol.* **1965**, *24*, 163.
- (69) Zioncheck, T. F.; Harrison, M. L.; Geahlen, R. L. Purification and Characterization of a Protein-Tyrosine Kinase from Bovine Thymus. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 15637-15641.
- (70) Schieffer, B.; Drexler, H. Therapie der chronischen Herzinsuffizienz mit ACE-Hemmern versus AT₁-Rezeptor-Antagonisten - Gibt es Unterschiede? *Herz* **1997**, *22*, 357-360.
- (71) Li, P.; Ferrario, C. M.; Broshnihan, K. B. Nonpeptide Angiotensin II Antagonist Losartan Inhibits Thromboxane A₂-Induced Contractions in Canine Coronary Arteries. *J. Pharm. Exp. Ther.* **1997**, *281*, 1065-1070.
- (72) Hsueh, W. A.; Law, R. E.; Do, Y. S. Integrins, Adhesion and Cardiac Remodelling. *Hypertension* **1998**, *31*, 176-180.
- (73) Munzenmaier, D. H.; Greene, A. S. Opposing Actions of Angiotensin II on Microvascular Growth and Arterial Blood Pressure. *Hypertension* **1996**, *27*, 760-765.
- (74) Yamada, T.; Horiuchi, M.; Dzau, V. J. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 156-160.
- (75) Sandberg, K.; Ji, H.; Clark, A. J. L.; Shapira, H.; Catt, K. J. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 9455.

- (76) Chiu, A. T.; Heblin, W. F.; McCall, D. E.; Ardecky, R. J.; Carini, D. J.; Duncia, J. V.; Pease, L. J.; Wong, P. C.; Wexler, R. R.; Johnson, A. L.; Timmermans, P. B. M. W. M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *165*, 196.
- (77) Smith, R. D.; Timmermans, P. B. M. W. M. Human angiotensin receptor subtypes. *Nephrology and Hypertension* **1994**, *13*, 112-122.
- (78) Jackson, E. K.; Garrison, J. C. Renin and Angiotensin. In *Goodman & Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics*; 9. ed.; J. G. Hardman, L. E. Limbird, P. B. Molinoff, R. W. Ruddon and A. Goodman Gilman, Ed.; McGraw-Hill: New York, 1996, S. 733-758.
- (79) Wexler, R. R.; Greenlee, W. J.; Irvin, J. D.; Goldberg, M. R.; Prendergast, K.; Smith, R. D.; Timmermans, P. B. M. W. M. Nonpeptide Angiotensin II Receptor Antagonists: The Next Generation in Antihypertensive Therapy. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 625-656.
- (80) Böhm, H.-J.; Klebe, G.; Kubinyi, H. *Wirkstoffdesign - Der Weg zum Arzneimittel*; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 1996, S. 599.
- (81) Dominiak, P.; Dendorfer, A. Das Renin-Angiotensin-System. In *AT₁-Rezeptorantagonisten - Angiotensin II*; P. Dominiak and T. Unger, Ed.; Steinkopff: Darmstadt, 1997; S. 41-73.
- (82) Gallinat, S.; Edling, O.; Unger, T. Das Renin-Angiotensin-System. In *AT₁-Rezeptorantagonisten - Angiotensin II*; P. Dominiak and T. Unger, Ed.; Steinkopff: Darmstadt, 1997; S. 8-40.
- (83) Middlemiss, D.; Watson, S. P. A Medicinal Chemistry Case Study: An Account of an Angiotensin II Antagonist Drug Discovery Programme. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 13049-13080.
- (84) Griendling, K. K.; Lassègue, B.; Murphy, T. J.; Alexander, R. W. Angiotensin II Receptor Pharmacology. *Adv. Pharmacol.* **1994**, *28*, 269-306.
- (85) Hunyady, L.; Balla, T.; Catt, K. J. The ligand binding site of the angiotensin AT₁ receptor. *TiPS* **1996**, *17*, 135-140.
- (86) Schieffer, B.; Paxton, W. G.; Marrero, M. B.; Bernstein, K. E. Importance of Tyrosine Phosphorylation in Angiotensin II Type 1 Receptor Signaling. *Hypertension* **1996**, *27*, 476-480.
- (87) Regitz-Zagrosek, V.; Neuss, M.; Fleck, E. Effects of angiotensin receptor antagonists in heart failure: clinical and experimental aspects. *Eur. Heart J.* **1995**, *16 Suppl. N*, 86-91.
- (88) Wong, P. C.; Chiu, A. T.; Duncia, J. V.; Heblin, W. F.; Smith, R. D.; Timmermans, P. B. M. W. M. Angiotensin II Receptor Antagonists and Receptor Subtypes. *TEM* **1992**, *3*, 211-217.
- (89) Murphy, T. J.; Alexander, R. W.; Griendling, K. K.; Runge, M. S.; Bernstein, K. E. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* **1991**, *351*, 233-236.
- (90) Moore, G. J.; Ganter, R. C.; Matsoukas, J. M.; Hondrelis, J.; Agelis, G.; Barlos, K.; Wilkinson, S.; Sandall, J.; Fowler, P. The importance of the aromatic ring quadrupole for receptor interactions of the position 4 side chains of angiotensin-II analogues. In *Peptides: Chemistry, Structure and Biology*; R. S. Hodges and J. A. Smith, Ed.; ESCOM: Leiden, 1993; Vol. XIII; S. 690-691.

- (91) Kambayashi, Y.; Takahashi, K.; Bardhan, S.; Inagami, T. Molecular structure and function of angiotensin type 2 receptor. *Kidney International* **1994**, *46*, 1502-1504.
- (92) Timmermans, P. B. M. W. M.; Wong, P. C.; Chiu, A. T.; Herblin, W. F.; Benfield, P.; Carini, D. J.; Lee, R. J.; Wexler, R. R.; Saye, J. A.; Smith, R. D. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.* **1993**, *45*, 205-251.
- (93) Wong, P. C.; Price, W. A.; Chiu, A. T.; Duncia, J. V.; Carini, D.; Wexler, R. R.; Johnson, A. L. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. XI. Pharmacology of EXP 3174: An active metabolite of DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1990**, *255*, 211-217.
- (94) Yun, C.-H.; Lee, H. S.; Rho, H. K.; Jeong, H. G.; Guengerich, F. P. Oxidation of the angiotensin II receptor antagonist Losartan (DuP 753) in human liver microsomes. *Drug Metab. Disp.* **1995**, *23*, 285-289.
- (95) Stearns, R. A.; Miller, R. R.; Doss, G. A.; Chakravarty, P. K.; Rosegay, A.; Gatto, G. J.; Chiu, S.-H. L. The metabolism of DuP 753, a nonpeptide Angiotensin II receptor antagonist, by rat, monkey, and human liver slices. *Drug Metab. Disp.* **1992**, *20*, 281-287.
- (96) Stearns, R. A.; Chakravarty, P. C.; Chen, R.; Chiu, S.-H. L. Biotransformation of Losartan to its active carboxylic acid metabolite in human liver microsomes. *Drug Metab. Disp.* **1995**, *23*, 207-215.
- (97) DeVita, R. J.; Bochis, R.; Frontier, A. J.; Kotliar, A.; Fisher, M. H.; Schoen, W. R.; Wyvratt, M. J.; Cheng, K.; Chan, W. W.-S.; Butler, B.; Jacks, T. M.; Hickey, G. J.; Schleim, K. D.; Leung, K.; Sheng, Z.; Chiu, S.-H. L.; Feeney, W. P.; Cunningham, P. K.; Smith, R. G. A Potent, Orally Bioavailable Benzazepinone Growth Hormone Secretagogue. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1716-1728.
- (98) Schoen, W. R.; Pisano, J. M.; Prendergast, K.; Matthew J. Wyvratt, J.; Fisher, M. H.; Cheng, K.; Chan, W. W.-S.; Butler, B.; Smith, R. G.; Ball, R. G. A Novel 3-Substituted Benzazepinone Growth Hormone Secretagogue (L-692,429). *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 897-906.
- (99) Smith, R. G.; Cheng, K.; Schoen, W. R.; Pong, S.-S.; Hickey, G.; Jacks, T.; Butler, B.; Chan, W. W.-S.; Chaung, L.-Y. P.; Judith, F.; Taylor, J.; Wyvratt, M. J.; Fisher, M. H. A Novel 3-Substituted Benzazepinone Growth Hormone Secretagogue (L-692,429). *J. Med. Chem.* **1993**, *260*, 1640-1643.
- (100) Nikiforovich, G. V.; Marshall, G. R. Three-Dimensional Recognition Requirements for Angiotensin Agonists: A Novel Solution for an Old Problem. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *195*, 222-228.
- (101) Printz, M. P.; Nemethy, G.; Bleich, H. Proposed Models for Angiotensin II in Aqueous Solution and Conclusions about Receptor Topography. *Nature* **1972**, *237*, 135.
- (102) Spear, K. L.; Brown, M. S.; Reinhard, E. J.; McMahon, E. G.; Olins, G. M.; Palomo, M. A.; Patton, D. R. Conformational Restriction of Angiotensin II: Cyclic Analogues Having High Potency. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1935-1940.
- (103) Schmidt, B.; Lindman, S.; Tong, W.; Lindeberg, G.; Gogoll, A.; Lai, Z.; Thörnwall, M.; Synnergren, B.; Nilsson, A.; Welch, C. J.; Sohtell, M.; Westerlund, C.; Nyberg, F.; Karlén, A.; Hallberg, A. Design, Synthesis and Biological Activities of Four Angiotensin II Receptor Ligands with γ -Turn Mimetics Replacing Amino Acid Residues 3-5. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 903-919.

- (104) Merrifield, B.; Tam, J. P. Strong Acid Deprotection of Synthetic Peptides: Mechanisms and Methods. In *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Special Methods in Peptide Synthesis, Part C*; S. Udenfriend and J. Meienhofer, Ed.; Academic Press: San Diego, 1987; Vol. 9; S. 185-248.
- (105) Ye, T.; McKervey, M. A. Organic Synthesis with α -Diazocarbonyl Compounds. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 1091-1160.
- (106) Hoffmann, H. M. R.; Iqbal, M. N. Improved Procedure for the Generation of Allyl Cations from Simple Dibromoketones. Change of Mechanism on Reaction with Triethyl Borate and Zinc. Cycloadditions to Conjugated Dienes. *Tetrahedron Lett.* **1975**, 4487-4490.
- (107) Attenburrow, J.; Elks, J.; Elliott, D. F.; Hems, B. A.; Harris, J. O.; Brodrick, C. I. Experiments Relating to the Synthesis of Patulin. Part I. A Study of Hydrogenated γ -Pyrones. *Journal of the Chemical Society* **1945**, 571-577.
- (108) Hanessian, S. *Preparative carbohydrate chemistry*; Marcel Dekker: New York, 1997.
- (109) Lampe, T. F. J.; Hoffmann, H. M. R.; Bornscheuer, U. T. Lipase Mediated Desymmetrization of *Meso* 2,6-Di(acetoxymethyl)-tetrahydropyran-4-one Derivatives. An Innovative Route to Enantiopure 2,4,6-Trifunctionalized C-Glycosides. *Tetrahedron Asymm.* **1996**, *7*, 2889-2900.
- (110) Pryor, K. E.; Shipps Jr., G. W.; Skyler, D. A.; Rebek Jr., J. The Activated Core Approach to Combinatorial Chemistry: A Selection of New Core Molecules. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4107-4124.
- (111) Seebach, D.; Jaeschke, G.; Wang, Y. M. Hoch enantioselektive Öffnung cyclischer *meso*-Anhydride zu Isopropylhalbestern mit Diisopropoxytitan-TADDOLaten. *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2605-2606.
- (112) Kühn, C.; Lindeberg, G.; Gogoll, A.; Hallberg, A.; Schmidt, B. Fmoc Protected Peptide Mimetic Based on a Cyclohexane Framework and Incorporation into Angiotensin II. *Tetrahedron* **1997**, 12497-12504.
- (113) Corey, E. J.; Clark, D. A. A New Method for the Synthesis of 2-Pyridinethiol Carboxylic Esters. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 2875-2878.
- (114) Corey, E. J.; Iguchi, S.; Albright, J. O.; De, B. Studies on the Conformational Mobility of Arachidonic acid. Facile Macrolactonization of 20-Hydroxyarachidonic Acid. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 37-40.
- (115) Einhorn, J.; Einhorn, C.; Luche, J.-L. A Convenient Method for the Preparation of N-Methoxamides. *Synth. Commun.* **1990**, *20*, 1105-1112.
- (116) Mentzel, M.; Hoffmann, H. M. R. *N*-Methoxy-*N*-methylamides (Weinreb Amides) in Modern Organic Synthesis. *J. prakt. Chem.* **1997**, *339*, 517-524.
- (117) Nahm, S.; Weinreb, S. M. *N*-Methoxy-methylamides as effective acylating agents. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3815-3818.
- (118) Santos, P. F.; Lobo, A. M.; Prabhakar, S. A Convenient Method for the Preparation of *N*-Aryl and *N*-Alkyl-*O*-methyl Hydroxylamines. *Synth. Commun.* **1995**, *25*, 3509-3518.
- (119) Mukaiyama, T.; Araki, M.; Takei, H. Reaction of *S*-(2-Pyridyl) Thioates with Grignard Reagents. A Convenient Method for the Preparation of Ketones. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 4763-4765.
- (120) Meldal, M.; Juliano, M. A.; Jansson, A. M. Azido Acids in a Novel Method of Solid-Phase Peptide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2531-2534.

- (121) Armstrong, S. K. Ring closing diene metathesis in organic synthesis. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1998**, 371-388.
- (122) Grubbs, R. H.; Miller, S. J.; Fu, G. C. Ring-Closing Metathesis and Related Processes in Organic Synthesis. *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 446-452.
- (123) Schneider, M. F.; Junga, H.; Blechert, S. Rhenium and Ruthenium Induced Ring Closing Olefin Metathesis to Hydrazulenes. *Tetrahedron* **1995**, 51, 13003-13014.
- (124) Hafner, A.; van der Scharf, P. A.; Mühlebach, A. Recent Developments in Ring-Opening Metathesis Polymerization (ROMP). *Chimia* **1996**, 50, 131-140.
- (125) Herrmann, W. A.; Wagner, W.; Flessner, U. N.; Volkhardt, U.; Komber, H. Methyltrioxorhenium als Katalysator für die Olefin-Metathese. *Angew. Chem.* **1991**, 103, 1704-1706.
- (126) Hashmi, A. S. K. $(PCy_3)_2Cl_2Ru=CHR$: An Efficient and Selective Reagent for the Formation of C=C Double Bonds by Non-Polymerizing Metathesis Reactions. *J. prakt. Chem.* **1997**, 339, 195-199.
- (127) Herrmann, W. A.; Fischer, R. W.; Rauch, M. U.; Scherer, W. Alkylrhenium oxides as homogeneous epoxidation catalysts: activity, selectivity, stability, deactivation. *J. Mol. Catal.* **1994**, 86, 243-266.
- (128) Bitan, G.; Muller, D.; Kasher, R.; Gluhov, E. V.; Gilon, C. Building units for N-backbone cyclic peptides. 4. Synthesis of protected N^α -functionalized alkyl amino acids by reductive alkylation of natural amino acids. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1997**, 1501-1510.
- (129) Muller, D.; Zeltser, I.; Bitan, G.; Gilon, C. Building Units for N-Backbone Cyclic Peptides. 3. Synthesis of Protected N^α -(ω -Aminoalkyl) Amino Acids and N^α -(ω -Carboxyalkyl) Amino Acids. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 411-416.
- (130) Byk, G.; Gilon, C. Building Units for N-Backbone Cyclic Peptides. 1. Synthesis of Protected N-(ω -Aminoalkylene)amino Acids and Their Incorporation into Dipeptide Units. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 5687-5692.
- (131) Bitan, G.; Gilon, C. Building Units for N-Backbone Cyclic Peptides. 2. Synthesis of Protected N-(ω -Thioalkylene) Amino Acids and Their Incorporation into Dipeptide Units. *Tetrahedron* **1995**, 51, 10513-10522.
- (132) Bitan, G.; Sukhotinsky, I.; Mashriki, Y.; Hanani, M.; Selinger, Z.; Gilon, C. Synthesis and biological activity of novel backbone-bicyclic Substance-P analogs containing lactam and disulfide bridges. *J. Peptide Res.* **1997**, 49, 421-426.
- (133) Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Kent, S. B. H.; Moos, W. H. Efficient Method for the Preparation of Peptoids [Oligo(N -substituted glycines)] by Submonomer Solid-Phase Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10646-10647.
- (134) Humphrey, J. M.; Chamberlain, A. R. Chemical Synthesis of Natural Product Peptides: Coupling Methods for the Incorporation of Noncoded Amino Acids into Peptides. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 2243-2266.
- (135) Herrmann, W. A.; Roesky, P. W.; Wang, M.; Scherer, W. Multiple Bonds between Main-Group Elements and Transition Metals. 135. Oxorhenium(V) Catalysts for the Olefination of Aldehydes. *Organometallics* **1994**, 13, 4531-4535.
- (136) Schmalz, H.-G. Katalytische Ringschluß-Metathese: ein neues, leistungsfähiges Konzept zur C-C-Verknüpfung in der Organischen Synthese. *Angew. Chem.* **1995**, 107, 1981-1984.

- (137) Schmidt, B. Methyltrioxorhenium - From Oxidation and Cyclopropanation to Metathesis. *J. prakt. Chem.* **1997**, *339*, 493-496.
- (138) Dias, E. L.; Nguyen, S. T.; Grubbs, R. H. Well-Defined Ruthenium Olefin Metathesis Catalysts: Mechanism and Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3887-3897.
- (139) Schwab, P.; Grubbs, R. H.; Ziller, J. W. Synthesis and Applications of $\text{RuCl}_2(=\text{CHR}')(\text{PR}_3)_2$: The Influence of the Alkylidene Moiety on Metathesis Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 100-110.
- (140) Wu, Z.; Nguyen, S. T.; Grubbs, R. H.; Ziller, J. W. Reactions of Ruthenium Carbenes of the Type $(\text{PPh}_3)_2\text{X}_2\text{Ru}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CPh}_2$ (X = Cl and CF_3COO) with Strained Acyclic Olefins and Functional Groups. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5503-5511.
- (141) Fu, G. C.; Grubbs, R. H. Synthesis of Nitrogen Heterocycles via Catalytic Ring-Closing Metathesis of Dienes. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7324-7325.
- (142) Wenger, R. M. Synthesis of Cyclosporine - Synthesis of Boc-D-Ala-MeLeu-MeVal-OH, a Part of the Peptide Sequence of Cyclosporine, by Different Strategic Ways and Synthesis of its Isomers Boc-D-Ala-MeLeu-D-MeLeu-MeVal-OH, and Boc-D-Ala-MeLeu-MeLeu-D-MeVal-OH as Reference Compounds. *Helv. Chim. Acta* **1983**, *66*, 2672-2702.
- (143) Rich, D. H.; Bhatnagar, P.; Mathiapparanam, P.; Grant, J. A.; Tam, J. P. Synthesis of Tentoxin and Related Dehydro Cyclic Tetrapeptides. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 296-302.
- (144) Fürstner, A.; Langemann, K. Total Synthesis of (+)-Ricinelaic Acid Lactone and of (-)-Gloeosporone Based on Transition Metal-Catalyzed C-C Bond Formations. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9130-9136.
- (145) Rubini, E.; Chorev, M.; Gilon, C.; Friedman, Z. Y.; Wormser, U.; Selinger, Z. Enzymatically Stable, Partially Modified Retro-Inverso Analogs of Substance P - Synthesis and Biological Activity. In *Petides: Synthesis - Structure - Function, Proc. of the 7th Am. Peptide Symp.*; D. H. Rich and E. Gross, Ed.; Pierce Chemical Company: Rockford, Il., 1981; S. 593-597.
- (146) Coste, J.; Dufour, M.-N.; Pantaloni, A.; Castro, B. BroP: A New Reagent for Coupling N-Methylated Amino Acids. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 669-672.
- (147) Coste, J.; Frérot, E.; Jouin, P. Coupling N-Methylated Amino Acids Using PyBroP and PyCloP Halogenphosphonium Salts: Mechanism and Fields of Application. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2437-2446.
- (148) Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Krause, E.; Brudel, M.; Winter, R.; Schümann, M.; Carpino, L. A.; Bienert, M. Fmoc Amino Acid Fluorides: Convenient Reagents for the Solid-Phase Assembly of Peptides Incorporating Sterically Hindered Residues. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3275-3280.
- (149) Plucinska, K.; Kataoka, T.; Yodo, M.; Cody, W. L.; He, J. X.; Humblet, C.; Lu, G. H.; Lunney, E.; Major, T. C.; Panek, R. L.; Schelkun, P.; Skeean, R.; Marshall, G. R. Multiple Binding Modes for the Receptor-Bound Conformations of Cyclic AII Agonists. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1902-1913.
- (150) Dougherty, D. A. Cation- π interactions in Chemistry and Biology: A New View of Benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science* **1996**, *271*, 163-168.

- (151) Nikiforovich, G. V.; Kao, J. L.-F.; Plucinska, K.; Zhang, W. J.; Marshall, G. R. Conformational Analysis of Two Cyclic Analogs of Angiotensin: Implications for the Biologically Active Conformation. *Biochemistry* **1994**, *33*, 3591-3598.
- (152) Khosla, M. C.; Smeby, R. R.; Bumpus, F. M. Structure Activity Relationship in Angiotensin II Analogs. In *Handbook of Exp. Pharmacol.* 1974; Vol. 37; S. 126-161.
- (153) Jorgensen, E. C.; Rapaka, S. R.; Windridge, G. C.; Lee, T. C. Angiotensin II Analogs 7.¹ Stereochemical Factors in the Positioning Influencing Pressor Activity. 2. *J. Med. Chem.* **1971**, *14*, 904-906.
- (154) Samanen, J.; Cash, T.; Narindray, D.; Brandeis, E.; W. Adams, J.; Weidman, H.; Yellin, T. An Investigation of Angiotensin II Agonist and Antagonist Analogues with 5,5-Dimethylthiazolidine-4-carboxylic Acid and Other Constrained Amino Acids. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 3036-3043.
- (155) Garcia, K. C.; Ronco, P. M.; Veroust, P. J.; Brünger, A. T.; Amzel, L. M. Three-Dimensional Structure of an Angiotensin II-Fab Complex at 3Å: Hormone Recognition by an Anti-Idiotypic Antibody. *Science* **1992**, *257*, 502-507.
- (156) Samanen, J. M.; Peishoff, C. E.; Keenan, R. M.; Weinstock, J. Refinement of a Molecular Model of Angiotensin II (AII) Employed in the Discovery of Potent Nonpeptide Antagonists. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 909-914.
- (157) Samanen, J.; Aiyar, N.; Edwards, R. Modifications to angiotensin II (AII) peptide analogs that reduce AT₁ receptor affinity have little to no effect upon AT₂ receptor affinity. In *Peptides: Chemistry, Structure and Biology*; R. S. Hodges and J. A. Smith, Ed.; ESCOM: Leiden, 1993; Vol. XIII; S. 640-642.
- (158) Imperiali, B.; Fisher, S. L. (S)- α -Amino-2,2'-bipyridine-6-propanoic Acid: A Versatile Amino Acid for de Novo Metalloprotein Design. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8527-8528.
- (159) Palmers, C. R.; Sloan, L. S.; Adrian Jr., J. C.; Cuenoud, B.; Paoletta, D. N.; Schepartz, A. DNA Bending and Binding by Metallo-Zipper Models of bZIP Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8899-8907.
- (160) Neidleman, S. L.; Geigert, J. *Biohalogenation: Principles, Basic Roles and Applications*; Ellis Horwood Limited: Chichester, 1986, S. 203.
- (161) Colpas, G. J.; Hamstra, B. J.; Kampf, J. W.; Pecoraro, V. L. Functional Models for Vanadium Haloperoxidase: Reactivity and Mechanism of Halide Oxidation. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3469-3478.
- (162) Lindeberg, G.; Bennich, H.; Engström, Å. Purification of Synthetic Peptides. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC). *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1991**, *38*, 253-259.
- (163) Lamture, J. B.; Wensel, T. G. A Novel Reagent for Labelling Macromolecules with Intensely Luminescent Lanthanide Complexes. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 4141-4144.
- (164) Thorn, D. L.; Harlow, R. L.; Herron, N. Phosphatovanadium Chemistry: Behaviour of Phosphato Groups Covalently Bound to Only One Vanadyl Center. *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 547-548.
- (165) Takalo, H.; Pasanen, P.; Kankare, J. Synthesis of 4-(Phenylethynyl)-2,6-bis[*N,N*-bis(carboxymethyl)aminomethyl]pyridine. *Acta Chem. Scand. Ser. B* **1988**, *42*, 373-377.
- (166) Takalo, H.; Pasanen, P.; Kankare, J. Synthesis of Dimethyl and Diethyl 4-(Phenylethynyl)-2,2-pyridinedicarboxylate. *Acta Chem. Scand. Ser. B* **1987**, *41*, 219-221.

- (167) Jackson, R. F. W.; Turner, D.; Block, M. H. Carbonylative coupling of organozinc reagents in the presence and absence of aryl iodides: synthesis of unsymmetrical and symmetrical ketones. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1997**, 865-870.
- (168) Jackson, R. F. W.; Turner, D.; Block, M. H. Carbonylative Coupling of an Amino Acid-derived Organozinc Reagent with Functionalized Aryl Iodides: Synthesis of Kynurenine. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 2207-2208.
- (169) Spencer, A. A Highly Efficient Version of the Palladium-catalyzed Arylation of Alkenes with Aryl Bromides. *J. Organomet. Chem.* **1983**, 258, 101.
- (170) Garman, A. J. *Non-radioactive Labelling - A Practical Introduction*; Academic Press: San Diego, 1997.
- (171) Eigen, M.; Rigler, R. Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 5740-5747.
- (172) Barnes, M. D.; Whitten, W. B.; Ramsey, J. M. Detecting single molecules in solution. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 418A-423A.
- (173) Nguyen, D. C.; Keller, R. A.; Jett, J. H.; Martin, J. C. Detection of single molecules of phycoerythrin in hydrodynamically focused flows by laser-induced fluorescence. *Anal. Chem.* **1987**, 59, 2158-2161.
- (174) Diamandis, E. P.; Christopoulos, T. K.; Bean, C. C. Quantitative Western blot analysis and spot immunodetection using time-resolved fluorometry. *J. Immunol. Meth.* **1992**, 147, 251-259.
- (175) Mathis, G. Probing molecular interactions with homogeneous techniques based on rare earth cryptates and fluorescence energy transfer. *Clin. Chem.* **1995**, 41, 1391-1397.
- (176) Markela, E.; Ståhlberg, T. H.; Hemmilä, I. Europium-labelled recombinant protein G. *J. Immun. Meth.* **1993**, 161, 1-6.
- (177) Renaud, F.; Piguet, C.; Bernardinelli, G.; Bünzli, J.-C. G.; Hopfgartner, G. In Search for Mononuclear Helical Lanthanide Building Blocks with Predetermined Properties: Lanthanide Complexes with Diethyl Pyridine-2,6-dicarboxylate. *Chem. Eur. J.* **1997**, 3, 1660-1667.
- (178) Criegee, R.; Marchand, B.; Wannowius, H. Zur Kenntnis der organischen Osmium-Verbindungen. *Liebigs Ann. Chem.* **1942**, 550, 99.
- (179) Johnson, R. A.; Sharpless, K. B. Catalytic Asymmetric Dihydroxylation. In *Catalytic Asymmetric Synthesis*; I. Ojima, Ed.; VCH: Weinheim, 1993; S. 227-272.
- (180) Kolb, H. C.; VanNieuwenhze, M. S.; Sharpless, K. B. Catalytic Asymmetric Dihydroxylation. *Chem. Rev.* **1994**, 94, 2483-2547.
- (181) Rouhi, A. M. A Reaction Under Scrutiny. *C&EN* **1997**, 75, 23-26.
- (182) Norrby, P.-O.; Becker, H.; Sharpless, K. B. Toward an Understanding of the High Enantioselectivity in the Osmium-Catalyzed Asymmetric Dihydroxylation. 3. New Insights into Isomeric Forms of the Putative Osmaoxetane Intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 35-42.
- (183) Corey, E. J.; Noe, M. C. Kinetic Investigations Provide Additional Evidence That an Enzyme-like Binding Pocket is Crucial for High Enantioselectivity in the Bis-Cinchona Alkaloid Catalyzed Asymmetric Dihydroxylation of Olefins. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 319-329.

- (184) Norrby, P.-O.; Gable, K. P. Kinetic Constraints on Possible Reaction Pathways for Osmium-catalyzed Asymmetric Dihydroxylation. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II* **1996**, 171-178.
- (185) Corey, E. J.; Noe, M. C. A Critical Analysis of the Mechanistic Basis of Enantioselectivity in the Bis-Cinchona Alkaloid Catalyzed Dihydroxylation of Olefins. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11038-11053.
- (186) Veldkamp, A.; Frenking, G. Mechanism of the Enantioselective Dihydroxylation of Olefins by OsO₄ in the Presence of Chiral Bases. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4937-4946.
- (187) Sharpless, K. B.; Teranishi, A. Y.; Bäckvall, J.-E. Chromyl Chloride Oxidation of Olefin. Possible Role of Organometallic Intermediates in the Oxidations of Olefins by Oxo Transition Metal Species. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 3120-3128.
- (188) Schlodder, R.; Ibers, J. A.; Lenarda, M.; Graziani, M. Structure and Mechanism of Formation of the Metallaioxacyclobutane Complex Pt[C₂(CN)₄O][As(C₆H₅)₃]₂, the Product of the Reaction between Tetracyanooxirane and Pt[As(C₆H₅)₃]₄. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 6893-6900.
- (189) Göbel, T.; Sharpless, K. B. Temperatureeffekte bei der asymmetrischen Dihydroxylierung: Hinweis auf einen schrittweisen Mechanismus. *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1417-1418.
- (190) Gable, K. P.; Juliette, J. J. J. Extrusion of Alkenes from Rhenium(V) Diolates: The Effect of Substitution and Conformation. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 955-962.
- (191) Gable, K. P. Condensation of Vicinal Diols with the Oxo Complex {Cp*Re(O)}₂(μ-O)₂ Giving the Corresponding Diolate Complexes. *Organometallics* **1994**, *13*, 2486-2488.
- (192) Gable, K. P.; Juliette, J. J. J. Hammett Studies on Alkene Extrusion from Rhenium(V) Diolates and an MO Description of Metal Alkoxide-Alkyl Metal Oxo Interconversion. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2625-2633.
- (193) DelMonte, A. J.; Haller, J.; Houk, K. N.; Sharpless, K. B.; Singleton, D. A.; Strassner, T.; Thomas, A. A. Experimental and Theoretical Kinetic Isotope Effects for Asymmetric Dihydroxylation. Evidence Supporting a Rate-Limiting "(3+2)" Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9907-9908.
- (194) Norrby, P.-O.; Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. Calculations on the Reaction of Ruthenium Tetroxide with Olefins Using Density Functional Theory (DFT). Implications for the Possibility of Intermediates in the Osmium-Catalyzed Dihydroxylation. *Organometallics* **1994**, *13*, 344-347.
- (195) Torrent, M.; Deng, L.; Duran, M.; Sola, M.; Ziegler, T. Density Functional Study of the [2+2]- and [2+3]-Cycloaddition Mechanisms for the Osmium-Catalyzed Dihydroxylation of Olefins. *Organometallics* **1997**, *16*, 13-19.
- (196) Jenner, G. Pericyclic Reactions. In *Organic High Pressure Chemistry*; W. J. Le Noble, Ed.; Elsevier: Amsterdam, 1988; Vol. 37.
- (197) Hillers, S.; Reiser, O. First Determination of the rate acceleration of a palladium-catalysed coupling reaction by use of high pressure. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1996**, 2197-2198.

- (198) Pestovsky, O.; van Eldik, R.; Huston, P.; Espenson, J. H. Mechanistic Study of the Coordination of Hydrogen Peroxide to Methylrhenium Oxide. *J. Chem. Soc., Dalton Trans* **1995**, 133-137.
- (199) van Eldik, R. Elucidation of Reaction Pathways through Volume Profile Analysis. In *Perspectives in Coordination Chemistry*; A. F. Williams, C. Floriani and A. E. Merbach, Ed.; VCH: Basel, 1992; S. 55-65.
- (200) Timmermans, J.; Kasanin, M. Recherches sur l'Analyse Piézométrique. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1959**, *68*, 527-540.
- (201) Nelson, D. W.; Gypser, A.; Ho, P. T.; Kolb, H. C.; Kondo, T.; Kwong, H.-L.; McGrath, D. V.; Rubin, A. E.; Norrby, P.-O.; Gable, K.; Sharpless, K. B. Toward an Understanding of the High Enantioselectivity in the Osmium-Catalyzed Asymmetric Dihydroxylation. 4. Electronic Effects in Amine-Accelerated Osmylations. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1840-1858.
- (202) Lehn, J.-M. *Supramolecular Chemistry*; VCH: Weinheim, 1995.
- (203) Fabbrizzi, L.; Poggi, A. Sensors and Switches from Supramolecular Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24*, 197-202.
- (204) Philp, D.; Stoddart, J. F. Selbstorganisation in natürlichen und in nichtnatürlichen Systemen. *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1243-1286.
- (205) De Cola, L. Assembling Metal Complexes and Bridging Ligands for Photoactive Supramolecular Systems. *Chimia* **1996**, *50*, 214-217.
- (206) Fujita, M. Supramolecular Self-Assembly of Finite and Infinite Frameworks through Coordination. *J. Synth. Org. Chem., Jpn* **1996**, *54*, 953-963.
- (207) Williams, A. Helical Complexes and Beyond. *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 15-19.
- (208) van Veggel, F. C. J. M.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N. Metallomacrocycles: Supramolecular Chemistry with Hard and Soft Metal Cations in Action. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 279-300.
- (209) Ward, M. D. Metal-Metal Interactions in Binuclear Complexes Exhibiting Mixed Valency; Molecular Wires and Switches. *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24*, 121-134.
- (210) Hanan, G. S.; Lehn, J.-M.; Kyritsakas, N.; Fischer, J. Molecular Helicity: a General Approach for Helicity Induction in a Polyheterocyclic Molecular Strand. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 765-766.
- (211) Fletcher, N. C.; Keene, R. F.; Viebrock, H.; von Zelewsky, A. Molecular Architecture of Polynuclear Rhenium Bipyridyl Complexes with Controlled Metal Helicity. *Inorg. Chem.* **1997**, *35*, 3931-3935.
- (212) Hayoz, P.; von Zelewsky, A.; Stoeckli-Evans, H. Stereoselective Synthesis of Octahedral Complexes with Predetermined Helical Chirality. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5111-5114.
- (213) Pfeil, A.; Lehn, J.-M. Helicate Self-Organisation: Positive Cooperativity in the Self-assembly of Double-helical Metal Complexes. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 838-840.
- (214) von Zelewsky, A. New Coordination Compounds for Photochemical Purposes and Beyond. *Chimia* **1994**, *48*, 331-335.
- (215) Piguet, C.; Bernardellini, G.; Hopfgartner, G. Helicates as Versatile Supramolecular Complexes. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2005-2062.

- (216) Marquis-Rigault, A.; Dupont-Gervais, A.; Van Dorsselaer, A.; Lehn, J.-M. Investigation of the Self-Assembly Pathway of Pentanuclear Helicates by Electrospary Mass Spectrometry. *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 1395-1398.
- (217) Hasenknopf, B.; Lehn, J.-M. Trinuclear Double Helicates of Iron(II) and Nickel(II): Self-Assembly and Resolution into Helical Enantiomers. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 1643-1650.
- (218) Wärnmark, K.; Thomas, J. A.; Heyke, O.; Lehn, J.-M. Stereoisomerically Controlled Inorganic Architectures: Synthesis of Enantio- and Diastereomerically Pure Ruthenium-Palladium Molecular Rods from Enantiopure Building Blocks. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1996**, 689-800.
- (219) Sleiman, H.; Baxter, P.; Lehn, J.-M.; Rissanen, K. Self-assembly of Rigid-rack Multimetallic Complexes of Rotaxane-type. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 715-716.
- (220) Goulle, V.; Harriman, A.; Lehn, J.-M. An Electro-photoswitch: Redox-Switching of the Luminescence of a Bipyridine Metal Complex. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 1034-1036.
- (221) Sakaki, S.; Ishikura, H.; Kuraki, K.; Tanak, K.; Satoh, T.; Arai, T.; Hamada, T. *J. Chem. Soc., Dalton Trans* **1997**, 1815.
- (222) Mürner, H.; von Zelewsky, A.; Stoeckli-Evans, H. Octahedral Complexes with Pre-determined Helical Chirality: Xylene Bridged-Bis([4,5]-pineno-2,2'-bipyridine) Ligands (Chiragen[o-, m-, p-xyl]) with Ruthenium(II). *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 3931-3935.
- (223) Mürner, H.; Belser, P.; von Zelewsky, A. New Configurationally Stable Chiral Building Blocks for Polynuclear Coordination Compounds: Ru(chiragen[X]Cl₂). *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7989-7994.
- (224) Hayoz, P.; von Zelewsky, A. New Versatile Optically Active Bipyridines as Building Blocks for Helicating and Caging Ligands. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5165-5168.
- (225) Gunde, K. E.; Credi, A.; Jandrasics, E.; von Zelewsky, A.; Richardson, F. S. Chiroptical Absorption and Luminescence Spectra of a Dissymmetric Osmium(II)-Polypyridyl Complex Containing an Optically Active Bis(bipyridine)-Type Ligand of Well-Defined Structural Chirality. *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 426-434.
- (226) Denti, G.; Serroni, S.; Campagna, S.; Juris, A.; Ciano, M.; Balzani, V. Perspectives in Coordination Chemistry. In *Perspectives in Coordination Chemistry*; A. F. Williams, C. Floriani and A. E. Merbach, Ed.; VCH: Basel, 1992; S. 153-164.
- (227) Huck, N. P. M.; Jager, W. F.; de Lange, B.; Feringa, B. L. Dynamic Control and Amplification of Molecular Chirality by Circular Polarized Light. *Science* **1996**, *273*, 1686-1688.
- (228) Liebermann, M.; Tabet, M.; Sasaki, T. Dynamic Structure and Potential Energy Surface of a Three-Helix Bundle Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5035-5044.
- (229) Holladay, M. W.; Dart, M. J.; Lynch, J. K. Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors as Targets for Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 4169-4194.
- (230) Müller, C. E. Epibatidin - ein nicotinartiges, analgetisch wirksames Alkaloid aus Pfeilgiftfröschen. *Pharmazie in unserer Zeit* **1996**, *25*, 85-92.
- (231) Kellar, K. J. Epibatidine: Its Pharmacological Actions and Utility for Studying Neuronal Nicotinic Receptors. *Neurotransmissions* **1995**, *XI*, 1-5.
- (232) Gol'dfarb, Y. L.; Godovikowa, S. N. Concerning the Structure of the Amination Products of Nicotine. *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci.* **1961**, 331.

- (233) Zoltewicz, J. A.; Cruskie Jr., M. P.; Dill, C. D. Use of Pyridine N-Oxide and Pyridinium Ion Synthons in the Preparation of Oligopyridines. Two New Unsymmetrical Quaterpyridines with 2,2-Bipyridine Units. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 4239-4244.
- (234) Zoltewicz, J. A.; Cruskie Jr., M. P. Strategies for the Synthesis of Unsymmetrical Quaterpyridines Using Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 11393-11400.
- (235) Zoltewicz, J. A.; Cruskie Jr., M. P. Total Synthesis of the Incorrectly Proposed Quaterpyridine Isolated from the Hoplonemertine Sea Worm. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 11401-11410.
- (236) Zoltewicz, J. A.; Cruskie Jr., M. P. N-Methylation and N-Oxidation of the Less Reactive Nitrogen Atom of a 2,3-Bipyridine. Two General Methods for Polyazines. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 3103-3114.
- (237) Kalinin, V. N. Carbon-Carbon Bond Formation in Heterocycles Using Ni- and Pd-Catalyzed Reactions. *Synthesis* **1992**, 413-432.
- (238) Taylor, E. C.; Boyer, N. E. Pyridine-1-oxides. IV. Nicotine-1-oxide, Nicotine-1'-oxide, and Nicotine-1,1'-dioxide. *J. Org. Chem.* **1959**, *24*, 275-277.
- (239) Fontenas, C.; Bejan, E.; Ait Haddou, H.; Balavoine, G. G. A. The Boekelheide Reaction: Trifluoroacetic Anhydride as a Convenient Acylating Agent. *Synth. Commun.* **1995**, *25*, 629-633.
- (240) McWhinnie, W. R.; Poller, R. C.; Thevarasa, M. An Inclusion Compound from Hexaphenylditin and Tetraphenyltin. *J. Organomet. Chem.* **1968**, *11*, 499-502.
- (241) Schmidt, B.; Neitemeier, V. 6-Pyridylnicotine and Bis-6,6'-nicotine - New Chiral 2,2'-Bipyridines. *Synthesis* **1998**, 42-44.
- (242) Karaborni, S.; Kesselink, K.; Hilbers, P. A. J.; Smit, B.; Karthäuser, J.; van Os, N. M.; Zana, R. Simulating the Self-Assembly of Gemini (Dimeric) Surfactants. *Nature* **1994**, *266*, 254-256.
- (243) Castro, M. J. L.; Kovensky, J.; Cirelli, A. F. Gemini Surfactants from Alkyl Glucosides. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3995-3998.
- (244) Töllner, K.; Popovitz, R.; Lahav, M.; Milstein, D. Impact of Molecular Order in Langmuir-Blodgett Films on Catalysis. *Science* **1997**, *278*, 2100-2102.
- (245) Yanagida, S.; Ogata, T.; Kuwana, Y.; Wada, Y.; Murakoshi, K.; Ishida, A.; Takamuku, S.; Kusaba, M.; Nakshima, N. Synthesis of 2,2'-:5',2'-terpyridine and 2,2':5',2":5",2""-quaterpyridine and their photocatalysis of the reduction of water. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II* **1996**, 1963-1969.
- (246) Seddon, E. A.; Seddon, K. R. *The Chemistry of Ruthenium*; Elsevier: Amsterdam, 1984; Vol. 19, S. 1373.
- (247) Conrad, R. A.; Cullinan, G. J.; Gerzon, K.; Poore, G. A. Structure-Activity Relationships of Dimeric *Catharanthus* Alkaloids. 2. Experimental Antitumor Activities of N-Substituted Deacetylvinblastine Amide (Vindesine) Sulfates. *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 391-400.
- (248) Speziale, A. J.; Jaworski, E. G. N-Substituted Glycinate and Alaninate Esters. *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 729-732.
- (249) Marletta, M. A.; Kenyon, G. L. Affinity Labeling of Creatinine Kinase by N-(2,3-Epoxypropyl)-N-amidinoglycine. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 1879-1886.

Stichwort- und Abkürzungsverzeichnis

- # Cystein, Cysteinyll..... 69
- A**
- γ -Schleife.....6
- ACE
- Angiotensin Converting
 Enzyme26
- Adenylatcyclase31
- Ala
- Alanin, Alanyl69
- Ang I
- Angiotensin I.....26
- Ang II
- Angiotensin II54
- Angiogenese23
- Apoptose.....28; 32
- Arg
- Arginin.....23
- AT₁
- Angiotensin II Typ 1
 Rezeptor28
- AT₂
- Angiotensin II Typ 2
 Rezeptor28
- $\alpha_v\beta_3$ -Integrin.....23
- B**
- β -Faltblattstruktur.....15
- β II'-Schleife17
- BSA34
- C**
- cAMP
- cyclisches Adenosinmono-
 phosphat.....31
- Captopril.....26
- Cys
- D**
- DCM
- Dichlormethan 54
- DIEA
- Ethyl-diisopropylamin..... 51
- Disulfidbrücken 34
- Dithiothreitol
- threo-1,4-Dimercapto-2,3-
 butandiol 29
- DMF
- Dimethylformamid..... 54
- DMSO
- Dimethylsulfoxid 55
- Dolastatin 6
- D-Phe
- D-Phenylalanin 23
- DuP 753 36
- E**
- EC₅₀
- Konzentration mit 50%-
 Wirkung 65
- EDRF
- endothelium derived
 relaxing factor 28
- Enalapril 26
- Entropie..... 7
- extrazelluläre Regionen 34
- F**
- FK 506 15
- Fmoc
- 9-Fluorenylmethoxy-
 carbonyl..... 54
- G**
- Gerüstmetika..... 11
- glatte Gewebemuskulatur....34
- Gln
- Glutamin..... 5
- Gly
- Glycin..... 5
- G-Protein..... 33
- H**
- HBTU
- 2(1H-Benzotriazol-1-yl)-
 1,1,3,3-tetramethyl-
 uroniumhexafluoro-
 phosphat..... 54
- Hcy
- Homocystein,
 Homocysteinyll..... 41
- His
- Histidin..... 5
- Hypertrophie 28
- I**
- IC₅₀
- Konzentration mit 50%
 Verdrängung der
 Referenz..... 65
- Integrin23
- inverse γ -Schleife21
- IP₃
- Inositoltriphosphat 31
- Isosterer Austausch 11
- K**
- Ketomethylen12
- Kinaseinhibitoren 13; 32

L	Primäre, sekundäre und tertiäre Strukturen 4	Silandiolmethylen 15
Losartan.....34	Pro	SPPS
Lys	Prolin..... 61	solid phase peptide
Lysin..... 17	Proteinkinase C..... 32	synthesis12
M	Protein-Tyrosin-Kinase (PTK)	Start/Stop Kodierung..... 7
MPLC	Inhibitoren..... 13	Suizidinhibitor..... 14
medium pressure liquid	PTK	T
chromatography52	Proteintyrosinkinase..... 14	Transmembranregionen33
N	PyBOP	TRH
NMGly	Benzotriazol-1-yloxy-tris-	Thyrotropine releasing
N-(2-Mercaptoethyl)glycin61	pyrrolidinophospho-	hormone..... 22
N-Mercaptoethylglycin ..69	niumhexafluoro	Trp
P	phosphat 51	Tryptophan 5
PD123,17734	PyBroP	Tyr
PDMS	Bromotripyrrolidinophos-	Tyrosin, Tyrosyl..... 62
Plasma Desorption Mass	phoniumhexafluoro-	Ü
Spectrometry.....62	phosphat 55	Übergangszustandsmimetika 14
Peptide und Peptidmimetika..3	R	V
Phe	RCM	Val
Phenylalanin 5	ring closure metathesis.. 53	Valin..... 5; 23
PMB	Renin..... 26	Vanadat 32
p-Methoxybenzyl.....51	Rotamase..... 16	Y
Pmc	RP	YGGFL
2,2,5,7,8-Pentamethyl-	reversed phase..... 52	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu.... 12
chroman-6-sulfonyl....54	S	
	<i>scaffold</i> 11	