

# Stereochemische Eigenschaften als Diversitätselement: Festphasensynthese cyclischer RGD-Peptidderivate via asymmetrische Katalyse\*\*

D. Allen Annis, Olivier Helluin und Eric N. Jacobsen\*

Der Einsatz kombinatorischer und paralleler Synthesen als eine wichtige Strategie zur Suche und Optimierung pharmazeutischer Leitstrukturen führt zu gewaltigen und interessanten Herausforderungen auf dem Gebiet der Synthesemethoden.<sup>[1]</sup> Die Erstellung von Bibliotheken mit signifikanter struktureller und funktioneller Diversität erfordert Reaktionen, die nicht nur hoch effektiv, sondern auch sehr allgemein anwendbar sind. Da Festphasensynthesen die beste Methode zur Herstellung von Verbindungsbibliotheken sind, ist die Entwicklung von Reaktionen mit immobilisierten Substraten eine zusätzliche, besondere Herausforderung.

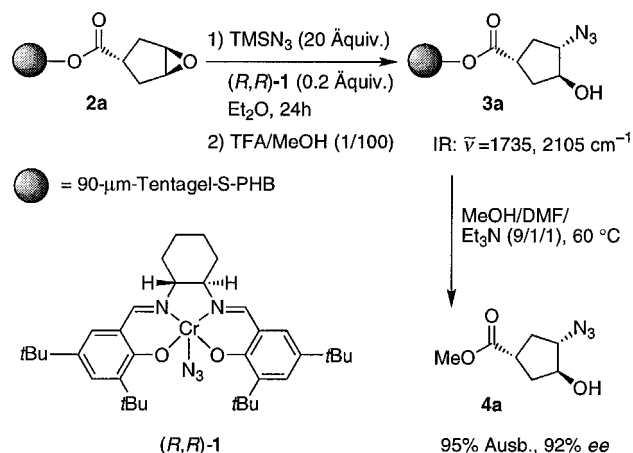
Trotz des bisherigen gewaltigen Fortschritts auf dem Gebiet der Festphasensynthesen,<sup>[2]</sup> haben stereoselektive Reaktionen dabei eine relativ geringe Rolle gespielt.<sup>[3, 4]</sup> Eine naheliegende Erklärung ist die, daß die absolute Stereokontrolle bei kombinatorischen Synthesen nicht wichtig ist. Wenn möglichst viele Verbindungen hergestellt werden sollen und das Screeningverfahren eine Bewertung der Mischungen und die nachfolgende Identifizierung einzelner Komponenten aus den Mischungen ermöglicht, so ist eine stereochemische Kontrolle nicht notwendig und in der Regel auch nicht erwünscht. Stehen allerdings die Spezifität und Affinität für eine Zielverbindung im Vordergrund, kann die Beurteilung stereoisomerenreiner Substanzen erforderlich sein. So kann sich die Spezifität für verschiedene Zielsubstanzen bei cyclischen Verbindungen, die die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD) enthalten, durch geringfügige strukturelle und stereochemische Änderungen im Peptidgerüst verändern.<sup>[5, 6]</sup> Mit dem Ziel, geeignete enantioselektive Methoden für Festphasensynthesen zu entwickeln, die bei der Leitstruktursuche und -optimierung von Nutzen sein können, beschreiben wir hier die asymmetrisch katalysierte Ringöffnung polymergebundener *meso*-Epoxide mit Trimethylsilylazid ( $\text{TMSN}_3$ )<sup>[7]</sup> und die Überführung der Produkte in stereochemisch unterschiedliche Grundstrukturen mit RGD-Pharmakophoren.

[\*] Prof. E. N. Jacobsen, D. A. Annis  
Department of Chemistry and Chemical Biology  
Harvard University  
12 Oxford St., Cambridge, MA 02138 (USA)  
Fax: (+1) 617-496-1880  
E-mail: jacobsen@chemistry.harvard.edu  
Dr. O. Helluin  
Department of Biochemistry and Biophysics  
University of Pennsylvania School of Medicine  
Philadelphia, PA 19104 (USA)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health (GM-43214), der Packard Foundation und der National Science Foundation (CHE96-3464) gefördert. D.A.A. dankt Schering Plough and Eli Lilly für ein Stipendium. Wir danken Prof. W. DeGrado für hilfreiche Diskussionen.

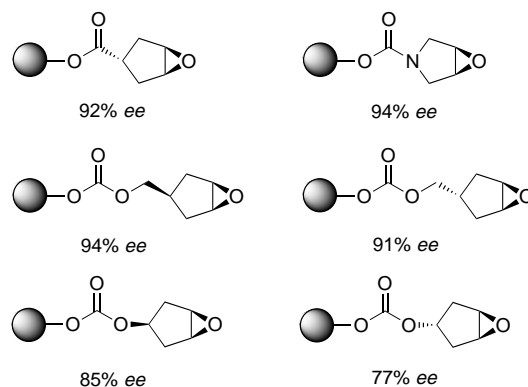
Weitere Informationen zu dieser Arbeit (die Strukturkoordinaten von (S,S)-9, (R,R)-9, (R,S)-12 und (S,R)-12 im PDB-Format) sind im WWW unter <http://www.wiley-vch.de/home/angewandte/> oder vom Autor erhältlich.

Die Reaktion des an TentaGel-S-PHB<sup>[8]</sup> gebundenen Epoxyesters **2a** mit  $\text{TMSN}_3$  im Überschuß in Gegenwart des [(salen)CrN<sub>3</sub>]-Komplexes<sup>[9]</sup> (*R,R*)-**1** war, wie IR-spektroskopisch nachgewiesen wurde, nach 24 h vollständig (Schema 1).



Schema 1. Asymmetrische, durch [(salen)CrN<sub>3</sub>] **1** katalysierte Ringöffnung von polymergebundenem *meso*-Epoxid.

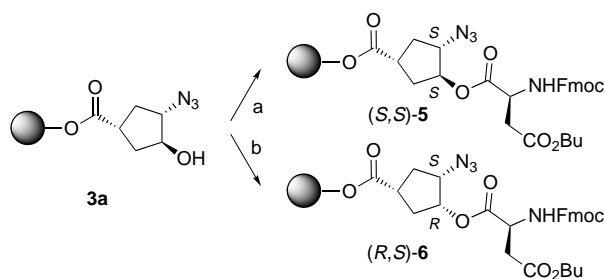
Das Produkt wurde isoliert, und überschüssiges Reagens sowie der Katalysator wurden abfiltriert. Nach Abspaltung der Silylgruppen mit Trifluoressigsäure in Methanol wurde der polymergebundene Azidoalkohol **3a** erhalten. Die Abspaltung durch Umesterung mit MeOH/DMF/Et<sub>3</sub>N (9/1/1) lieferte lösliches **4a** in >95% Ausbeute und mit 92% ee, wie <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopisch und gaschromatographisch nachgewiesen wurde. Diese asymmetrische Festphasenreaktion wurde mit einer Reihe anderer *meso*-Fünfringepoxide getestet (Schema 2). In allen Fällen erfolgte die Epoxidringöff-



Schema 2. Enantioselektivitäten der asymmetrischen Ringöffnung einiger polymergebundener *meso*-Epoxide.

nung problemlos unter Bildung des jeweiligen Azidoalkohols mit guten bis hervorragenden Enantiomerenüberschüssen.

Nachdem polymergebundene Epoxide sich als potentielle Substrate für eine asymmetrische Ringöffnung erwiesen hatten, wurden die erhaltenen optisch aktiven Azidoalkohole auf ihre Verwendbarkeit als konformativ eingeschränkte Template untersucht, die die pharmakophore RGD-Gruppierung enthalten. Die Synthesen der cyclischen Verbindungen (S,S)-9, (R,R)-9, (R,S)-12 und (S,R)-12 sind im Schema 3 und 4 wiedergegeben. Die Acylierung des trägergebundenen Alko-



Schema 3. Stereochemische Kontrolle durch Wahl der Acylierungsbedingungen. a) FmocAsp(OtBu), DIC, DMAP, DMF, 100 %; b) Mischung aus FmocAsp(OtBu) und PPh<sub>3</sub>/DEAD, THF, 0 °C, 90 % (+5 % *trans*-Produkt). – Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl; DIC = *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid; DMAP = 4-Dimethylaminopyridin; DEAD = Diethylazodicarboxylat.

hols (*S,S*)-**3a** mit FmocAsp(OtBu) gab den *trans*-Azidoester (*S,S*)-**5** in quantitativer Ausbeute (Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl). Die Veresterung unter Mitsunobu-Bedingungen<sup>[10]</sup> lieferte den entsprechenden *cis*-Azidoester (*R,S*)-**6**. Durch die Art der Veresterung kann somit zusätzliche stereochemische Diversität erreicht werden. Die durch HPLC bestimmte Diastereoselektivität beträgt > 15:1. Ausgehend von **5** und **6** wurden die RGD-Sequenz-haltigen, cyclischen Peptide nach bekannten Festphasenmethoden hergestellt.<sup>[11]</sup> Die Abspaltung vom Trägerharz und die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgten in einem Schritt. Durch präparative HPLC wurden die Makrocyclen (*S,S*)- und (*R,R*)-**9** mit dem Cyclopentylring in *trans*-Konfiguration als farblose Feststoffe in 64 bzw. 58 % Gesamtausbeute isoliert. (*R,S*)- und (*S,R*)-**12**, deren Cyclopentylring in *cis*-Konfiguration vorliegt, wurden analog in 59 bzw. 48 % Gesamtausbeute erhalten.

Um den Einfluß der Gerüstkonfiguration auf die Konformation des RGD-Pharmakophors beurteilen zu können, wurden die Strukturen der Makrocyclen in Lösung anhand

von 2D-NOESY-NMR-Spektren in [D<sub>6</sub>]DMSO durch Abstandsgeometrie/Energieminimierungs-Methoden bestimmt.<sup>[12]</sup> Abbildung 1 zeigt die Konformationen der cyclischen Peptide niedrigster Energie in Lösung. (*S,S*)-**9** weist

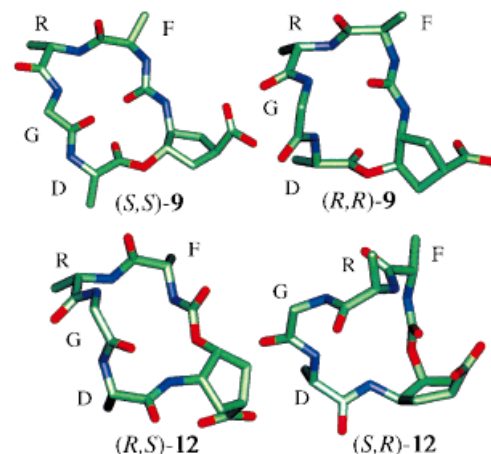
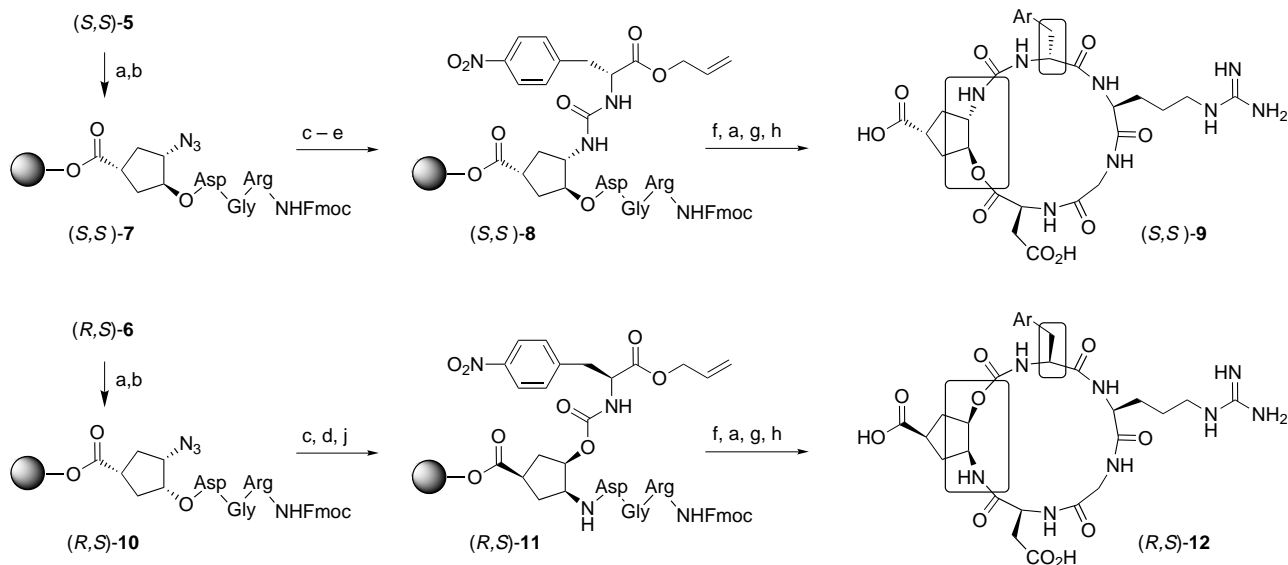


Abb. 1. Strukturen cyclischer RGD-Peptide in Lösung, die durch asymmetrische Ringöffnung von polymergebundenen Epoxiden erhalten wurden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Seitenketten weggelassen.

eine ebene Struktur mit einem Typ-II'- $\beta$ -Turn infolge einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Harnstoffcarbonyl- und der Glycin-NH-Gruppe auf, und die RGD-Sequenz liegt in einer gestreckten Konformation vor. Dagegen liegt in (*R,R*)-**9**, das aus dem enantiomeren *trans*-Aminoalkohol hergestellt wurde, ein Typ-I- $\beta$ -Turn vor, und die RGD-Sequenz ist im Bereich des Glycinrestes abgeknickt. Enantiomere Template bewirken somit unterschiedliche  $\beta$ -Turns, die eine drastische Konformationsänderung des RGD-Pharmakophors zur Folge



Schema 4. Synthese von die RGD-Sequenz enthaltenden Makrocyclen. a) Piperidin/DMF (1/4); b) FmocArg(Pmc)Gly, HBTU, DIPEA, DMF; c) SnCl<sub>2</sub>, Et<sub>3</sub>N, PhSH, THF; d) 2M Phosgen in PhMe, DIPEA, DMAP, THF, 0 °C; e) D-4-NO<sub>2</sub>PheOAll, DIPEA, DMAP, DMF; f) [Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>], CHCl<sub>3</sub>/HOAc/Morpholin (37/2/1); g) HATU, HOAt, DIPEA, THF; h) TFA/H<sub>2</sub>O/Me<sub>2</sub>S (90/5/5); j) L-4-NO<sub>2</sub>PheOAll, DIPEA, DMAP, DMF. – Pmc = 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl; HBTU = Benzotriazol-1-yl-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat; DIPEA = Diisopropylethylamin; All = Allyl; HATU = *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat; HOAt = 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol; TFA = Trifluoressigsäure.

haben. (*R,S*)- und (*S,R*)-**12**, die aus den enantiomeren *cis*-Aminoalkoholen synthetisiert wurden, enthalten  $\gamma$ -Turns an den Glycinresten; die Orientierung des  $\gamma$ -Turns ist jedoch wegen der Rotation um die D-G- und G-R-Amidebenen in bezug auf die Asp- und Arg-Seitenketten verschieden. Daraus resultiert eine entgegengesetzte Faltung der RGD-Gruppierung in (*R,S*)- und (*S,R*)-**12**.

Die signifikanten Konformationsunterschiede bei den stereoisomeren Peptiden veranlaßten uns, ihre Affinität zu den Integrinen  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_{IIb}\beta_3$  zu vergleichen.<sup>[13]</sup> Selektive Inhibitoren von  $\alpha_v\beta_3$  sind als Suppressoren tumorinduzierter Angiogenese vielversprechende Substanzen in der Krebstherapie, während  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Inhibitoren als potentielle Antithrombotika interessant sind.<sup>[6]</sup> Alle Verbindungen weisen  $\alpha_v\beta_3$ -Affinität auf, aber es bestehen erhebliche Unterschiede in der Selektivität für die beiden Integrinrezeptoren (Tabelle 1).

Tabelle 1. Inhibierung der Integrinbindung durch cyclische, RGD-Sequenz-haltige Verbindungen.

Verbindung	$\alpha_v\beta_3$ <sup>[a]</sup>	$\alpha_{IIb}\beta_3$ <sup>[b]</sup>	$\alpha_v\beta_3$ -Selektivität <sup>[c]</sup>
( <i>S,S</i> )- <b>9</b>	0.6	280	470
( <i>R,R</i> )- <b>9</b>	24	> 10 <sup>6</sup>	> 40 000
( <i>R,S</i> )- <b>12</b>	6.0	120	20
( <i>S,R</i> )- <b>12</b>	1.7	> 10 <sup>6</sup>	> 500 000

[a] IC<sub>50</sub> [ $\mu$ M], Plättchenadhäsion an Osteopontin. [b] IC<sub>50</sub> [ $\mu$ M], Plättchenadhäsion an Fibrinogen. [c] IC<sub>50</sub>( $\alpha_{IIb}\beta_3$ )/IC<sub>50</sub>( $\alpha_v\beta_3$ ).

So bindet (*S,R*)-**12** dreimal stärker an  $\alpha_v\beta_3$  und mehr als vier Größenordnungen weniger stark an  $\alpha_{IIb}\beta_3$  als (*R,S*)-**12**.<sup>[14]</sup> Wenn **12** als Diastereomergemisch aus racemischem Azidoalkohol **3a** hergestellt worden wäre, wäre die bedeutende  $\alpha_v\beta_3$ -Spezifität nicht erkannt worden.

Die Unterschiede der Konformation, Affinität und Selektivität der hier untersuchten cyclischen Peptide basieren auf den stereochemischen Veränderungen im Aminoalkohol-Rückgrat, und unterstreichen somit die zukünftige Bedeutung enantioselektiver Reaktionen bei der Herstellung von Substanzbibliotheken. Die Isolierung und Reinigung der Produkte wird bedeutend vereinfacht, indem die enantioselektive Reaktion mit polymergebundenen Substraten durchgeführt wird. Noch wichtiger ist, daß die Festphasensynthese die Möglichkeit bietet, die Substanzbibliotheken nach dem „Split-pool“-Verfahren unter gleichzeitiger Ringöffnung ähnlicher polymergebundener Epoxide herzustellen.

Eingegangen am 12. Februar 1998 [Z11471]

**Stichwörter:** Asymmetrische Katalyse • Festphasensynthese • Kombinatorische Chemie • Makrocyclen

- [1] a) M. A. Gallop, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. A. Fodor, E. M. Gordon, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 1233–1251; b) E. M. Gordon, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. A. Fodor, M. A. Gallop, *ibid.* **1994**, 37, 1385–1401; c) L. A. Thompson, J. A. Ellman, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 555–600.  
 [2] Übersichtsartikel zu organischen Festphasenreaktionen: a) P. H. H. Hermkens, H. C. J. Ottenheijm, D. Rees, *Tetrahedron* **1996**, 52, 4527–4554; b) *ibid.* **1997**, 53, 5643–5678.

- [3] a) M. Reggelin, V. Brenig, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 6851; b) J. S. Panek, B. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 12022, zit. Lit.  
 [4] Asymmetrische Katalyse bei polymergebundenen Substraten: a) I. Ojima, C.-Y. Tsai, Z. Zhang, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 5785–5788; b) H. Han, K. D. Janda, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 1835–1937; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1731–1733.  
 [5] a) M. Aumailly, M. Gurrath, G. Muller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.* **1991**, 291, 50–54; b) M. Pfaff, K. Tangemann, B. Muller, M. Gurrath, G. Muller, H. Kessler, R. Timpl, J. Engel, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 20233–20238; c) A. C. Bach II, J. R. Espina, S. A. Jackson, P. F. W. Stouten, J. L. Duke, S. A. Mousa, W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 293–294.  
 [6] Die endogenen Zielrezeptoren der RGD-Sequenzen, zu denen auch die Integrin-Rezeptoren gehören, sind zur Zeit von großem Interesse für die Entwicklung von blutgerinnungshemmenden, antimetastatischen und angiogenesehemmenden Wirkstoffen, vorausgesetzt, es kann eine Selektivität bei diesen Zielrezeptoren erreicht werden. Ein aktueller Übersichtsartikel: R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 1440–1456; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1374–1389.  
 [7] a) L. E. Martínez, J. L. Leighton, D. H. Carsten, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5897–5898; b) S. E. Schaus, J. F. Larrow, E. N. Jacobsen, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 4197.  
 [8] Wang-artiges Polystyrolharz mit aufgepfropften Polyethylenglycol-Einheiten, von dem die angeknüpften Verbindungen sauer abgespalten werden können; Advanced ChemTech, 5609 Fern Valley Rd., Louisville, KY 40228 (USA).  
 [9] J. L. Leighton, E. N. Jacobsen, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 389–90.  
 [10] Es war notwendig, das Phosphan, den Azodicarbonsäureester und die Carbonsäure als Gemisch einzusetzen, um unerwünschte Reaktionen des Phosphans mit dem polymergebundenen Azid zu vermeiden: D. Crich, H. Dyker, R. J. Harris, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 257–259.  
 [11] a) Azid-Reduktion: E. K. Kick, J. A. Ellman, *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 1427–1430. Die Reduktion der *cis*-Azido-Tripeptidester **10** war mit der Wanderung eines Acylrestes verbunden: G. Bellucci, R. Bianchini, C. Chiappe, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 3067–3073. b) Die Cyclisierung gelang mit dem Carpino-Reagens *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU): L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4397–4398.  
 [12] C. E. Peishoff, J. W. Bean, K. D. Kopple, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4416–4421.  
 [13] Die Bindungsaffinitäten zu  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_{IIb}\beta_3$  wurden erhalten, indem die Inhibierung der durch Agonisten ausgelösten Plättchenadhäsion an immobilisiertem Osteopontin bzw. Fibrinogen bestimmt wurde: J. S. Bennett, C. Chan, G. Vilare, S. A. Mousa, W. F. DeGrado, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 8137–8140.  
 [14] Cyclische RGD-Peptide mit  $\gamma$ -Turns am Glycinrest weisen  $\alpha_v\beta_3$ -Selektivität auf: R. Haubner, R. Graias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7461–7472. Zweifellos bringt der  $\gamma$ -Turn in (*R,S*)-**12** die pharmakophore Gruppe in eine für die Bindung an  $\alpha_v\beta_3$  ungünstige Position.