

beiden Raumgruppen *Pnma* und *Pn2₁a*. Aufgrund von Dichtebetrachtungen sollten sich vier Moleküle in der Elementarzelle befinden. Für die Raumgruppe *Pnma* hieße das, daß das Fluoresceinmolekül entweder auf einer Spiegelebene liegen müßte oder daß zwei Molekülhälften über ein Inversionszentrum miteinander korreliert wären. Da keine dieser beiden Annahmen für die chinoide Form des Fluoresceins plausibel ist, wurde die Raumgruppe auf *Pn2₁a* festgesetzt.

- [21] P.-E. Werner, L. Eriksson, M. Westdahl, *J. Appl. Crystallogr.* **1985**, *18*, 360.
- [22] M. Tremayne, B. M. Kariuki, K. D. M. Harris, OCTOPUS96 (Monte Carlo Technique For Powder Structure Solution), **1996**.
- [23] W. I. F. David, R. M. Ibbs, J. C. Matthewman, *Rutherford Appleton Laboratory Report*, RAL-92-032, **1992**.
- [24] Fluorescein bildet mit Methanol [4] und Aceton [25] 1:1-Komplexe; die Einkristall-Röntgenstrukturanalysen dieser Komplexe ergaben, daß das Fluorescein in der Lactonform vorliegt. Aceton und Methanol werden aus diesen Komplexen langsam abgegeben, wobei auf der Oberfläche ein roter, pulviger Überzug von Fluorescein entsteht.
- [25] R. S. Osborn, D. Rogers, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1975**, *31*, 359.

6-Guanidinopyranosen – neuartige Peptidmimetika auf Kohlenhydratbasis**

Hans Peter Wessel,* David Banner, Klaus Gubernator, Kurt Hilpert, Klaus Müller und Thomas Tschopp

Professor Hans Paulsen zum 75. Geburtstag gewidmet

Ein klassischer Ansatz zur Entwicklung von Medikamenten ist die Nachahmung von biologisch aktiven Peptiden, die Substrate für Enzyme oder Liganden von Rezeptoren sind, insbesondere durch nichtpeptidische Substanzen. Wir berichten nun über solche Peptidmimetika auf der Basis von Kohlenhydraten, die bei der Suche nach Thrombin-Inhibitoren entdeckt wurden. Thrombin ist ein Schlüsselenzym der Koagulationskaskade. Es spaltet Fibrinogen zu Fibrin, aktiviert die Koagulations-Cofaktoren V und VIII, ist ein Hauptstimulator in der Aktivierung der Blutplättchen und spielt damit eine zentrale Rolle sowohl bei der physiologischen Hämostase als auch bei der pathologischen Thrombose.^[1] Die direkte Hemmung von Thrombin scheint daher ein attraktiver Weg zu einem neuen Antithrombotikum zu sein, und einige synthetische Thrombin-Inhibitoren^[2,3] sind bereits in klinischer Erprobung.^[4]

Thrombin ist eine Serin-Protease mit großer Spezifität für Peptidsequenzen, die einen Argininrest enthalten.^[5] In bekannten Thrombin-Inhibitoren liegen daher Argininreste vor (z. B. in Argatroban^[6]), oder aber Guanidin- (z. B. in Ro 46-6240^[7]) oder Amidinreste (z. B. in NAPAP^[8]) als Argininmimetika. Wir haben 6-Guanidinohexosen untersucht, die formal als konformativ eingeschränkte Argininmimetika angesehen werden können. Einpassungen dieser Verbindungen in ein Enzymmodell führen zu der Voraussage, daß solche Verbindungen in der Thrombin-Erkennungstasche Platz finden sollten.

Der gute präparative Zugang zu 6-Guanidinohexosen aus den entsprechenden 6-Aminoderivaten mit 3,5-Dimethylpyrazolylformamidinium-nitrat (DPFN) wurde bereits beschrieben.^[9] Wir sind für unsere Versuche von Benzyl-2-benzylxy-carbonylamino-2,6-didesoxy-6-guanidinio- α -D-glucopyranosid-nitrat **1**^[10] ausgegangen, das an Palladium auf Kohle selektiv zum Glucosaminderivat **2** hydriert wurde (Schema 1). Die freie

[*] Dr. H. P. Wessel, Dr. D. Banner, Dr. K. Gubernator, Dr. K. Hilpert, Prof. K. Müller, Dr. T. Tschopp

Pharma Division, Präklinische Forschung

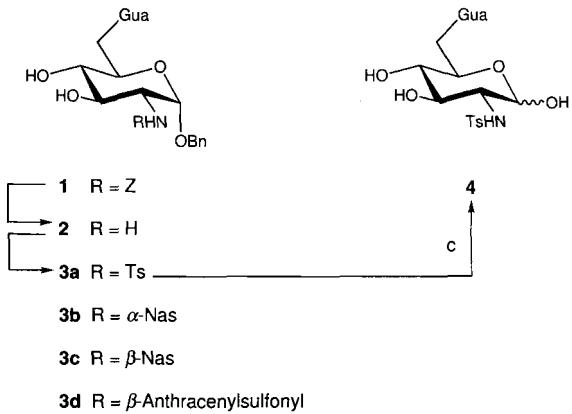
F. Hoffmann-La Roche AG

CH-4070 Basel (Schweiz)

Telefax: Int. + 61/688-6459

E-mail: hans_p.wessel@roche.com

[**] Wir danken Rudolf Minder und Roland Keller für experimentelle Arbeiten.



Schema 1. a) H_2 , Pd/C, MeOH/H₂O 2/1, Raumtemperatur (RT), 4 h, quantitativ; b) **3a**: TsCl, THF/H₂O 2/3, NEt₃, 0 °C, 6 h, 36%; **3b**: α -NasCl, H₂O/Pyridin 5/3, NEt₃, RT, 5 h, 95%; **3c**: β -NasCl, H₂O/Pyridin 5/3, NEt₃, RT, 5 h, 79%; **3d**: β -Anthracenylchlorid, H₂O/Pyridin 1/1, NEt₃, RT, 20 h, 78%; c) H_2 , Pd/C, EtOH/H₂O 1/1, RT, 18 h, quantitativ.

Aminogruppe konnte anschließend problemlos zu Amid- oder Sulfonamideinheiten umgesetzt werden; eine Reaktion der Hydroxygruppen wurde durch Wasser verhindert, und bei richtig gewähltem pH-Wert lag ein Guanidiniumsalz vor, d.h. Protonen dienten als „Schutzgruppe“ der Guanidinofunktion. So führte die Reaktion von **2** mit aromatischen Sulfonylchloriden zu den Sulfonamiden **3**.

Während Amidderivate von **2** keine nennenswerte biologische Aktivität zeigten, wurde mit dem Tosylderivat **3a** ein im μM -Bereich aktiver Thrombin-Inhibitor erhalten. Die α -Naphthylsulfonylverbindung **3b** erwies sich dagegen als inaktiv, während die analoge β -Naphthylsulfonylverbindung **3c**^[10] und die β -Anthracenylsulfonylverbindung **3d** eine noch etwas bessere Thrombinhemmung zeigten (Tabelle 1). Um die Selektivität

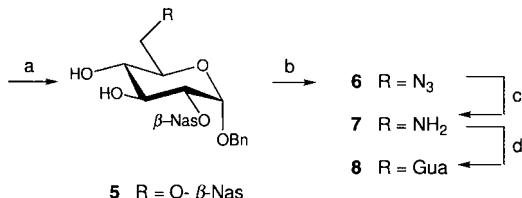
Tabelle 1. Thrombinhemmung durch einige Guanidinohexosen und deren Selektivitäten für Thrombin gegenüber Trypsin [a].

Verbindung	K_i [μM]	Selektivität
1	410	—
3a	4	19
3c	1.1	109
3d	0.9	>227
8	1.4	143

[a] Selektivität = $K_i(\text{Trypsin}) K_i(\text{Thrombin})^{-1}$.

tät der Thrombinhemmung abschätzen zu können, wurde parallel die Hemmung der verwandten, aber weniger diskriminierenden^[11] Serin-Protease Trypsin untersucht (Tabelle 1). Da nach dem Enzymmodell eine Wechselwirkung des anomeren Zentrums mit dem aktiven Zentrum von Thrombin möglich schien, wurde die 1-Benzylgruppe von **3a** hydrogenolytisch entfernt. Die resultierende freie Pyranose **4** (Schema 1) erwies sich aber als inaktiv, so daß davon ausgegangen werden kann, daß das anomere Zentrum nicht mit dem Serinrest der katalytischen Triade der untersuchten Serin-Proteasen interagiert.

Zur Untersuchung des Einflusses des Sulfonamid-Stickstoffatoms wurde ein analoges Sulfonat synthetisiert. Aktivierung von Benzyl- α -D-glucopyranosid mit Bis(tributylzinn)oxid und acylierende Umsetzung mit β -Naphthylsulfonylchlorid ergab wie erwartet^[12] das Bis(sulfonat) **5** als Hauptprodukt (Schema 2). Dem etablierten Syntheseweg^[19] folgend wurde über das Azid **6** und das Amin **7** die Guanidiniumverbindung **8**^[13] hergestellt. Dieses Sulfonat war ähnlich aktiv wie das analoge Sulfonamid **3c** und dabei etwas selektiver (siehe Tabelle 1).



Schema 2. a) Benzyl- α -D-glucopyranosid [20, 21], (Bu₃Sn)₂O, Toluol, Rückfluß, 4 h; β -NasCl, 60 °C, 15 h, 34%; b) NaN₃, DMF, 55 °C, 16 h, 79%; c) PPh₃, THF/H₂O 20/1, RT, 24 h, 95%; d) DPFN, DMF, 80 °C, 24 h, 49%.

Die Einlagerung in die Thrombin-Erkennungstasche wurde durch eine Kristallstrukturanalyse^[14] des Komplexes aus **8** und Thrombin bestätigt: Diese Guanidiniohexose bindet ohne direkten Kontakt zum Serinrest der katalytischen Triade („inhibitor binding mode“^[15]); es ist ersichtlich, daß die Naphthylgruppe in der D-Tasche^[16] und die Benzylgruppe in der P-Tasche bindet, die Guanidinogruppe befindet sich wie erwartet in der Erkennungstasche (Abb. 1).

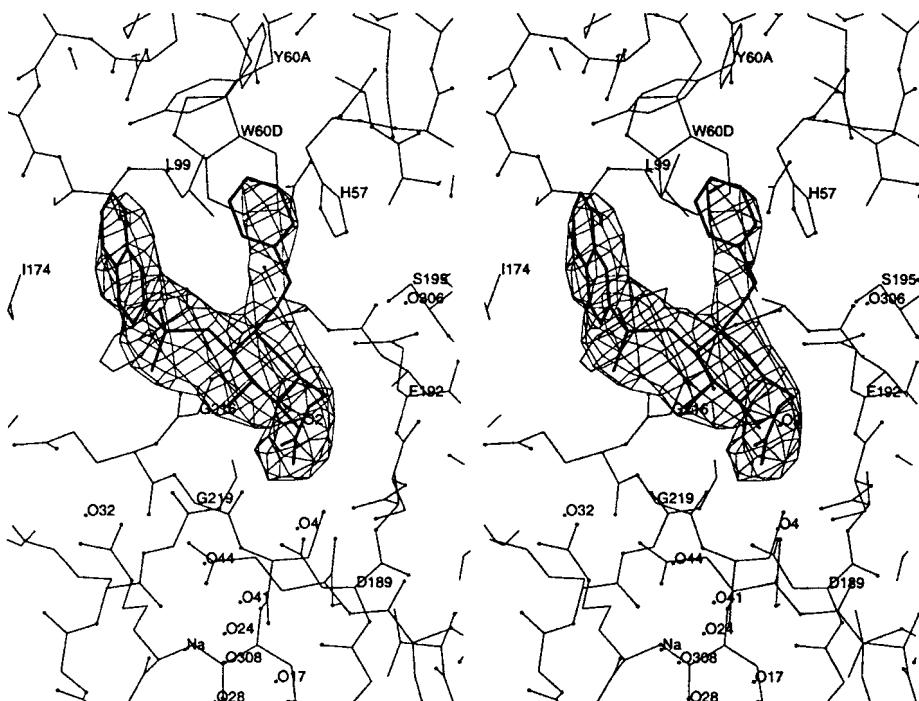


Abb. 1. Stereobild der verfeinerten Struktur des Komplexes aus **8** (Elektronendichtekontur-Darstellung) und Thrombin (Strichdarstellung) im Kristall. Die Wassermoleküle (gekennzeichnet mit O + Nummer) sind identisch mit denen, die in den analogen Komplexen anderer Thrombin-Inhibitoren gefunden wurden, nur O306 in der Oxidion-bindenden Tasche (rechts von **8**) ist neu. Anders als in den Komplexen der meisten anderen Thrombin-Inhibitoren gibt es keine Wasserstoffbrückenbindung zu Glycin 216 (von **8** verdeckt). Die Zuckerhydroxygruppen von **8** bilden nur eine Wasserstoffbrückenbindung zum Protein (zwischen O-3 und dem N-Proton von Glycin 219). Die Guanidinogruppe zeigt schwache Wechselwirkungen (3.4 und 3.9 Å) zu den Sauerstoffatomen des Asparaginrest D189 am Boden der Erkennungstasche, aber gute Wasserstoffbrückenbindungen (2.8 und 2.9 Å) zur C=O-Gruppe von Glycin 218 und zum Wassermolekül O2. Andere Konformationen der Guanidinogruppe wurden ebenfalls untersucht, erwiesen sich aber als ungünstiger. Dieses nicht optimale H-Brücken-Muster des Inhibitors **8** erklärt seine nur mäßige Aktivität.

Guanidinopyranosen können also in der Tat als Argininimetika fungieren. Eine analoge Verwendung von Aminohexosen als konformativ eingeschränkte Lysinmimetika ist denkbar. Ein Vorteil dieses Ansatzes ist, daß die präparativ leicht zugänglichen Hexosederivate wegen ihres hohen Funktionalisierungsgrades gut als Template^[17, 18] zur Einführung und Variation weiterer Gruppen geeignet sind.

Eingegangen am 4. Oktober 1996 [Z 9612]

Stichworte: Enzyminhibitoren · Guanidiniozucker · Kohlenhydrate · Peptidmimetika

- [1] J. W. Fenton II, *Semin. Thromb. Hemostasis* **1988**, *14*, 234.
- [2] J. Das, S. D. Kimball, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 999–1007.
- [3] C. Tapparelli, R. Metternich, C. Ehrhardt, N. S. Cook, *Trends Pharmacol. Sci.* **1993**, *14*, 366–376.
- [4] S. D. Kimball, *Curr. Pharm. Des.* **1995**, *1*, 441–468.
- [5] B. Blomback, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1986**, *485*, 120–123.
- [6] L. R. Bush, *Cardiovasc. Drug Revs.* **1991**, *9*, 247–263.
- [7] K. Hilpert, J. Ackermann, D. W. Banner, A. Gast, K. Gubernator, P. Hadváry, L. Labler, K. Müller, G. Schmid, T. Tschopp, H. van de Waterbeemd, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3889–3901.
- [8] J. Stürzebecher, F. Markwardt, B. Voigt, G. Wagner, P. Walsmann, *Thromb. Res.* **1983**, *29*, 635–642.
- [9] H. P. Wessel, *J. Carbohydr. Chem.* **1993**, *12*, 1173–1186.
- [10] Physikalische Daten von **3c**: $[\alpha]_D^{20} = +65.5$ ($c = 0.2$ in Methanol); FAB-MS: m/z (%): 501 (100, $[M + H]$); ¹H-NMR (250 MHz, $[D_6]DMSO$, TMS): $\delta = 8.47$ (d, 1H, Naphthyl-H), 8.15–7.85 (m, 10H, Naphthyl-H, NH), 7.73–7.60 (m, 3H, Naphthyl-H), 7.55–7.50 (m, 2H, Naphthyl-H), 7.37–7.25 (m, 5H, Ph), 5.30 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H, 3-OH), 4.88 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H, 4-OH), 4.59 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H, H-1), 4.49, 4.01 (2d, $J = 12.0$ Hz, 2H, CH_2Ph), 3.50 (ddd \approx dt, 1H, H-3), 3.49 (m, 1H, H-5), 3.40 (m, 2H, H-6), 3.17 (ddd \approx dt, 1H, H-2), 3.02 (ddd \approx dt, 1H, H-4).
- [11] E. E. Dibella, H. A. Scheraga, *Biochemistry* **1996**, *35*, 4427–4433.
- [12] T. Ogawa, M. Matsui, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 2363–2369.
- [13] Physikalische Daten von **8**: $[\alpha]_D^{20} = +83.6$ ($c = 1.0$ in Methanol); FAB-MS: m/z (%): 502 (100, $[M + H]$); ¹H-NMR (250 MHz, $[D_6]DMSO$, TMS): $\delta = 8.67$ (d, 1H, Naphthyl-H), 8.24–8.09 (m, 3H, Naphthyl-H), 7.89–7.70 (m, 3H, Naphthyl-H), 7.35–7.22 (m, 5H, Ph, NH), 7.06 (br., 4H, $C(NH_2)_2$), 5.52 (2d, 2H, 3-OH, 4-OH), 4.90 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H-1), 4.62, 4.22 (2d, $J = 11.6$ Hz, 2H, CH_2Ph), 4.19 (dd, $J = 9.7$ Hz, 1H, H-2), 3.64 (ddd \approx dt, $J = 6.0$, 8.9 Hz, 1H, H-3), 3.56 (ddd, $J = 3.0$, 5.8 Hz, H-5), 3.40, 3.32 (2dd, 2H, H-6), 3.09 (ddd \approx dt, $J = 6.5$, 9.6 Hz, 1H, H-4).
- [14] Kristalle des Komplexes aus Thrombin und **8** wurden hergestellt und wie beschrieben [7, 16] mit 3.3 Å Auflösung vermessen. Die mit der besten verfügbaren Thrombinstruktur ermittelte Differenzelektronendichte spricht dafür, daß der Inhibitor in der Erkennungstasche gebunden ist. Die Struktur des Komplexes wurde bis zu einem *R*-Wert von 12.6% verfeinert (Standardabweichungen: 0.011 Å für Bindungslängen, 1.88° für Bindungswinkel, 1.96° für Torsionswinkel, jeweils bezogen auf einen Standardparamettersatz [19]).
- [15] D. Banner, J. Ackermann, A. Gast, K. Gubernator, P. Hadváry, K. Hilpert, L. Labler, K. Müller, G. Schmid, T. Tschopp, H. van de Waterbeemd, B. Wirs in *Perspectives in Medicinal Chemistry* (Hrsg.: B. Testa, W. Führer, E. Kyburz, R. Giger), VCH, Weinheim, 1993, S. 27–43.
- [16] D. W. Banner, P. Hadváry, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 20085–20093.

- [17] Glucose als zentrales Templat zum Aufbau eines Mimetikums des Peptidhormons Somatostatin wurde beschrieben: R. Hirschmann, K. C. Nicolaou, S. Pietranico, E. M. Leahy, J. Salvino, B. Arison, M. A. Cichy, P. G. Spoors, W. C. Shakespear, P. A. Sprengeler, P. Hamley, A. B. Smith III, T. Reisine, K. Raynor, L. Maechler, C. Donaldson, W. Vale, R. M. Freidinger, M. R. Cascieri, C. D. Strader, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12550–12568.
- [18] Zuckeraminosäuren als nichtpeptidische Peptidmimetika sind zur Induktion bestimmter Peptidkonformationen eingesetzt worden: a) H. Kessler, R. Gratias, G. Hessler, M. Gurrath, G. Müller, *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1201–1205; b) E. Graf von Roedern, E. Lohof, G. Hessler, M. Hoffmann, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10156–10167.
- [19] R. A. Engh, R. Huber, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1991**, *47*, 392–400.
- [20] W. Meyer zu Reckendorf, U. Kamprath-Scholz, E. Bischof, N. Wassiliadou-Micheli, *Chem. Ber.* **1975**, *108*, 3397–3411.
- [21] H. P. Wessel, *J. Carbohydr. Chem.* **1988**, *7*, 263–269.

Die Glycosidierung von hydroxysubstituierten Triphenylphosphanen gestaltet sich äußerst schwierig,^[14] durch gängige Methoden zur homogenen Glycosidierung – sowohl mit Lewis-Säure-Katalysatoren als auch mit stöchiometrischen Mengen an Schwermetallaktivatoren – werden die gewünschten Produkte nur in unbefriedigenden Ausbeuten geliefert (2–14%). Dennoch konnten die neuen Liganden nach Optimierung der Reaktionsbedingungen einer Zweiphasen-Glycosidierung^[15, 16] und anschließender Abspaltung der Acetylgruppen in befriedigenden bis guten Ausbeuten hergestellt werden (Tabelle 1). Die im Überschuss eingesetzten acetylgeschützten Halopyranosen^[17] **1** wurden mit dem Glycosidacceptor *p*-Hydroxyphenyl-diphenylphosphan^[18] **2** im Zweiphasensystem Methylenchlorid/Natronlauge bei Raumtemperatur in Gegenwart des Phasentransferkatalysators Tetra-*n*-butylammoniumhydrogensulfat (TBAHS) umgesetzt. Anschließend wurde eine Zemplén-Verseifung der Acetylgruppen durchgeführt und das Produkt chromatographisch gereinigt (Schema 1).

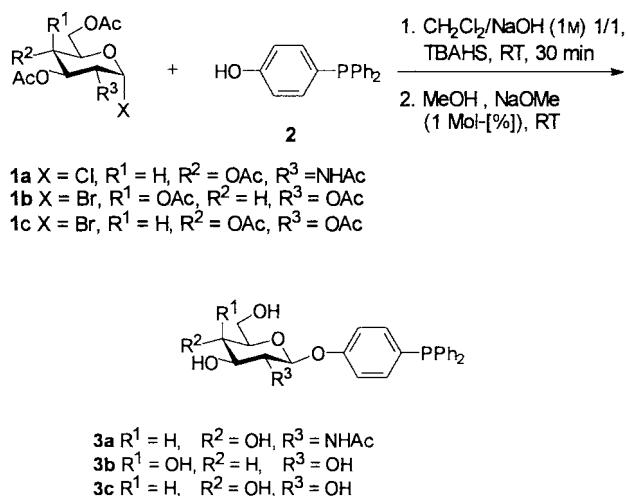
Kohlenhydratsubstituierte Triarylphosphane – eine neue Klasse von Liganden für die Zweiphasenkatalyse**

Matthias Beller,* Jürgen Gregor Elmar Krauter und Alexander Zapf

Die zwei grundlegenden Probleme der homogenen Katalyse – Katalysatorabtrennung und -rückführung – können durch die Zweiphasenkatalyse elegant gelöst werden.^[1] Dabei befindet sich der Katalysator in einer hydrophilen Phase, in der organische Produkte unlöslich sind. Zur Realisierung dieses Prinzips war die Entwicklung neuer, in hydrophilen Phasen löslicher Liganden notwendig. Die Diphenylphosphinoessigsäure^[2] und der erstmals von Kuntz hergestellte TPPTS-Ligand (TPPTS = Trinatriumsalz der 3,3',3"-Phosphantriylbenzolsulfonsäure)^[3] standen am Anfang der Entwicklung und werden heute für die bedeutendsten industriellen Zweiphasen-Prozesse – den Shell Higher Olefin Process (SHOP)^[2] und das Ruhrchemie/Rhône-Poulenc-Verfahren zur Hydroformylierung von Propen zu Butyraldehyd^[4] – im Tonnenmaßstab hergestellt und eingesetzt. Butadien-Telomerisation (Kuraray)^[5] und Allylsubstitution (Rhône-Poulenc)^[6] sind weitere technische Anwendungen der Zweiphasenkatalyse. Neue, derzeit im Labormaßstab entwickelte Methoden wie Aminierungen,^[7] Carbonylierungen,^[8] Hydrierungen^[9] und sogar bioorganische Anwendungen^[10] verdeutlichen die Aktualität der Zweiphasenkatalyse im Bereich der homogenen Katalyse. Um die Löslichkeit der Liganden in polaren Medien (insbesondere Wasser) zu erzielen, werden im allgemeinen ionische Gruppen (Sulfonsäure-, Carboxy-, quaternisierte Aminoalkyl/aryl-Gruppen und Phosphoniumsalze) als Substituenten in Phosphanen verwendet. Nichtionische Liganden, wie Phosphinoalkohole,^[11] Phosphane mit Polyether-Substituenten,^[12] Kronenether-substituierte Phosphane^[13] und Diphenylphosphinoalkyl-substituierte Kohlenhydrate,^[1, 2c] sind hingegen weit weniger verbreitet. Wir stellen hier eine neue Klasse von polaren, hydrophilen Triarylphosphanen für die Zweiphasenkatalyse vor, deren hydrophiler Charakter auf einen Zuckerrest zurückzuführen ist. Es handelt sich um Aryl- β -O-Glycoside der Glucose, Galactose und des Glucosamins.

[*] Prof. Dr. M. Beller, Dipl.-Chem. J. G. E. Krauter, Dipl.-Chem. A. Zapf
Anorganisch-chemisches Institut der Technischen Universität München
Lichtenbergstraße 4, D-85747 Garching
Telefax: Int. + 89/28913473
E-mail: mbeller@arthur.anorg.chemie.tu-muenchen.de

[**] Die Autoren danken Dr. S. Bogdanovic und Dr. S. Haber (Hoechst AG) für zahlreiche Diskussionen und der Hoechst AG für Chemikalienspenden.



Schema 1. Synthese der Glycosid-Triarylphosphane **3a–c**.

Tabelle 1. Ausbeuten an **3a–c** über zwei Stufen.

Verbindung	Stammzucker	Ausb. [%]
3a	Glucosamin	68
3a	Glucosamin	52 [a]
3b	Galactose	50 [a]
3c	Glucose	33

[a] Abweichend von der angegebenen Arbeitsvorschrift 1 Äquiv. 1, 2 Äquiv. 2. Ausbeute bezogen auf 1.

Die besten Ausbeuten wurden mit Galactose und Glucosamin (**3a, b**) erzielt; Glucose lieferte überraschenderweise geringere Ausbeuten (33%). Wegen des Nachbargruppeneffektes der Acetyschutzgruppe wurden hochstereoselektiv die β -verknüpften Glycoside gebildet. Als Nebenprodukte entstanden hauptsächlich die jeweiligen 2-Acetoxyglucale und im Falle des Glucosamins das entsprechende Dihydrooxazol, wobei mit Glucose erwartungsgemäß^[16] am meisten Nebenprodukte gebildet wurden.

Besondere Eigenschaft von Polyglycolether-haltigen Phosphanen ist die thermoreversible Solvatation,^[1] d. h. der reversible Verlust der Hydrathülle bei Erhöhung der Temperatur und