

Chimia 45 (1991) 367-376  
 © Schweiz. Chemiker-Verband; ISSN 0009-4293

# Renin-Inhibitoren – Von 'transition-state' Analogen und Peptidmimetika zu blutdrucksenkenden Wirkstoffen

Beat Weidmann\*



*Beat Weidmann:* Geboren 1953 in Döttingen, Kanton AG (Schweiz). Einstieg in die Chemie mit einer Laborantenlehre bei Ciba-Geigy AG. Dann, via zweitem Bildungsweg, Studium der Chemie an der ETH-Zürich. 1980-82 Dissertation auf dem Gebiet der Titan-organischen Reagenzien unter der Leitung von Prof. D. Seebach. 1983 'biochemisches' Postdoktorat bei Prof. R. Abeles an der Brandeis-Universität, Mass. (USA). Seit Ende 1983 in der präklinischen Forschung der Sandoz-Pharma AG auf verschiedenen Gebieten wie Herz-Kreislauf, Entzündung und Immunologie tätig. Zur Zeit als Leiter der Gruppe für zentrale Chemie.

**Abstract.** During the last 10 years, a great worldwide effort was devoted towards the discovery of orally active renin inhibitors as blood-pressure-lowering drugs. Design principles and synthesis of successive generations of renin inhibitors are discussed using selected examples. The progression from the concept of the 'transition-state' inhibitor, through compounds stable towards protease cleavage and hence towards orally active 'non-peptide' inhibitors is described. All this experience in design, molecular modelling, and synthesis – although not too successful for renin itself – has been applied to the search for inhibitors of other proteolytic enzymes. Thus, the extremely rapid progress made in identifying HIV-protease inhibitors was possible largely through the 'know how' obtained during the search for renin inhibitors.

## 1. Einleitung

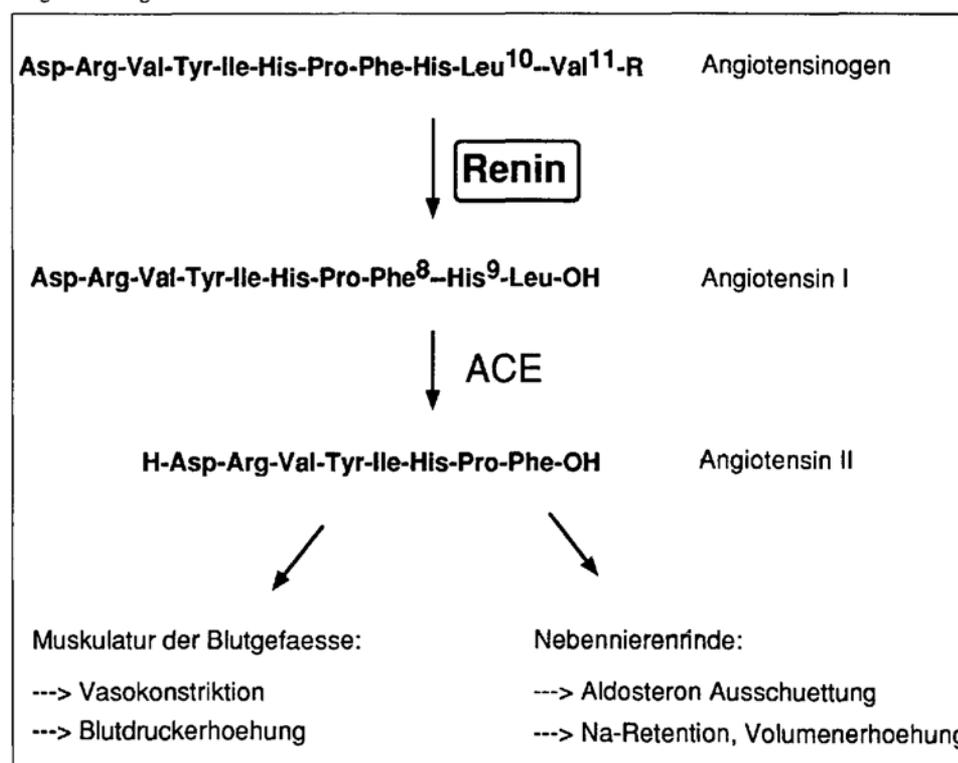
### 1.1. Das Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Blutdruckes und, damit verbunden, in der Kontrolle des Na-Haushaltes und des Volumengleichgewichtes. Das aktive Prinzip des RAS ist dabei das Angiotensin II (A II), das ein äusserst potentes, blutdruckerhöhendes Octapeptid ist. Die Biosynthese von A II als Endprodukt des RAS ist in *Schema 1* dargestellt. Es ist naheliegend, dass Hemmer der Biosynthese dieses endogenen Faktors, blutdrucksenkende Wirkstoffe sein sollten. In der Tat werden Blocker des 'Angiotensin-Converting'-Enzym (ACE) wie Captopril [1] oder Enalapril [2] schon seit Jahren äusserst erfolgreich in der antihypertensiven Therapie eingesetzt. Das grosse Interesse an Blockern des RAS-Systems *via* Renin-Hemmer kommt von der extrem hohen Spezifität des Renins: Angiotensinogen ist das einzige bis heute bekannte physiologische Substrat. Ganz im Gegensatz zum ACE, das in der Biosynthese von verschiedenen Peptidhormonen involviert ist. Mit der hohen Spezifität des Renins verbindet sich natürlich die Hoffnung, nebenwirkungsfreie Wirkstoffe zu finden. Zudem ist Renin der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Biosynthese von A II, so dass bei einer Hemmung dieses Enzyms das RAS besonders effizient blockiert werden sollte.

meinsamkeiten und eine grosse Sequenzhomologie aufweisen. Insbesondere besitzen alle zwei Aspartat-Reste in der aktiven Stelle. Primärsequenz und selbst X-Ray Strukturen sind heute für eine ganze Reihe von Asp-Proteasen inklusive Humanrenin bekannt

[3]. Die Wirkungsweise, wie Renin eine Amid-Bindung hydrolysiert, kann am besten verstanden werden, wenn von einer allgemeinen Säure-Base Katalyse als Mechanismus ausgegangen wird. Wasser greift dabei die (C=O)-Gruppe der zu spaltenden

*Schema 1. Das Renin-Angiotensin-System.* Angiotensinogen (mol. wt. ca. 60000), das physiologische Substrat für Renin, wird in der Leber synthetisiert und ist im Blut und anderen extrazellulären Flüssigkeiten weit verbreitet. Andererseits ist Renin ein proteolytisches Enzym (mol. wt. ca. 40000) das von einem dafür spezialisierten Teil der Niere (dem sogenannten juxtaglomerulären Apparat) hergestellt, gespeichert und aufgrund von gewissen Stimuli (z.B. niedrigem Blutdruck) in die Blutzirkulation sekretiert wird. Nachdem Angiotensin I durch Renin von seinem Substrat abgespalten worden ist, wird es durch das ACE weiter metabolisiert, das die letzten zwei Aminosäuren des Carboxy-Terminus entfernt. Das entstehende Octapeptid, Angiotensin II (A II) ist ein äusserst potentes, körpereigenes, blutdruckerhöhendes Prinzip. AII wird durch weitere Enzyme rasch zu biologisch inaktiven Fragmenten abgebaut.



### 1.2. Struktur und Mechanismus von Renin

Renin gehört zur Familie der Aspartylproteasen, die alle viele strukturelle Ge-

\*Korrespondenz: Dr. B. Weidmann  
 Sandoz-Pharma AG  
 Postfach, CH-4002 Basel

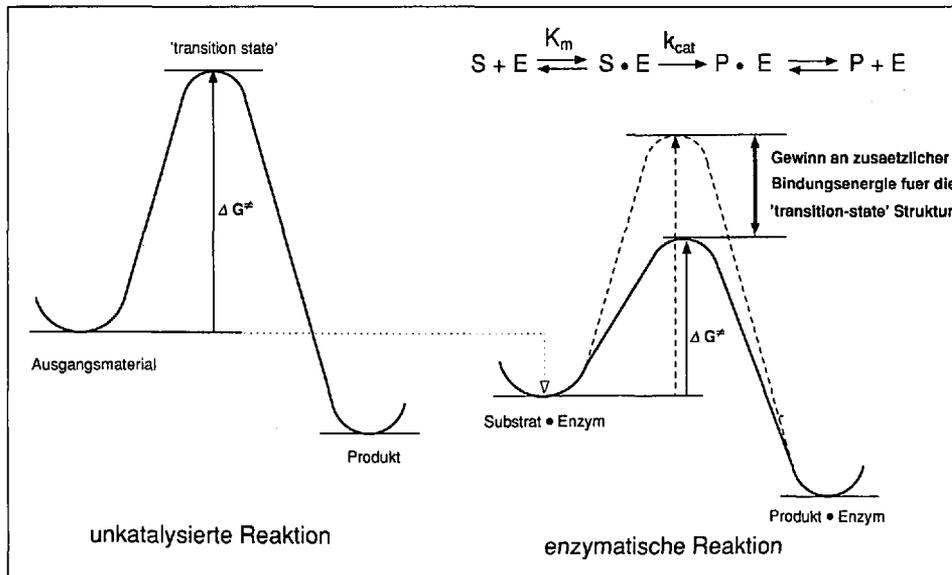


Fig. 1. Das Konzept der 'transition-state' Analoga. Dieses schematische Energieprofil verdeutlicht den Zusammenhang zwischen enzymatischer und nichtkatalysierter Reaktion. Die Differenz in der freien Energie zwischen 'transition-state' und Ausgangsmaterial  $\Delta G^\ddagger$  bestimmt, wie schnell eine Reaktion abläuft. Im enzymkatalysierten Fall ist der eigentlichen Reaktion die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes vorgelagert. Da sich dieses Gleichgewicht spontan einstellt, liegt der Substrat-Enzym-Komplex auf der Energieskala tiefer. Die Reaktion kann nun aber nicht einfach den gleichen Verlauf wie ohne Enzym beschreiten, weil dies lediglich (wie mit der gestrichelten Linie angedeutet) zu einer Parallelverschiebung des Energieprofils führen würde. Die für die Reaktionsgeschwindigkeit massgebende Grösse  $\Delta G^\ddagger$  bliebe dabei unverändert. Ohne auf mechanistische Details einzugehen, kann die beobachtete Beschleunigung der enzymatischen Reaktion dadurch erklärt werden, dass das Enzym den Übergangszustand sehr viel besser bindet als das Ausgangsmaterial. Die zusätzliche Bindungsenergie entspricht dabei der Abnahme der Aktivierungsenergie  $\Delta G^\ddagger$  im Vergleich zur nichtkatalysierten Umsetzung. Oder mit andern Worten: Verbindungen mit der Struktur des Übergangszustandes haben eine besonders hohe Affinität zum Enzym.

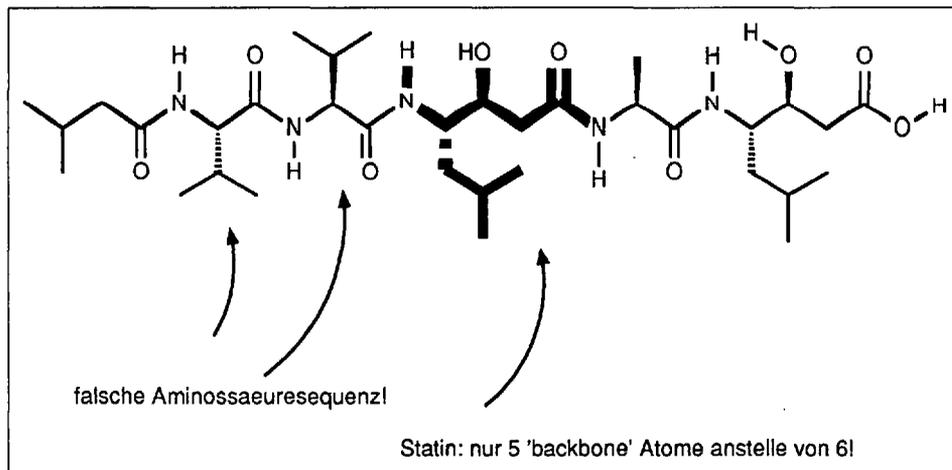


Fig. 2. Pepstatin: Die 'Lead'-Verbindung aus der Natur. Pepstatin enthält die ungewöhnliche Aminosäure Statin (fett gezeichnet). Sie hat schon von Natur aus eine Struktur, die den aus dem TS-'Approach' abgeleiteten Verbindungen verblüffend ähnlich ist. Dass Pepstatin als solches kein guter Renin-Hemmer ist, kann leicht mit der fehlenden Sequenz-Homologie mit dem Renin-Substrat erklärt werden.

Amid-Bindung an und die Aspartyl-Seitenketten der aktiven Stelle vermitteln die notwendigen Protonentransfers. Eine Zusammenstellung mechanistischer Untersuchungen findet sich in [4].

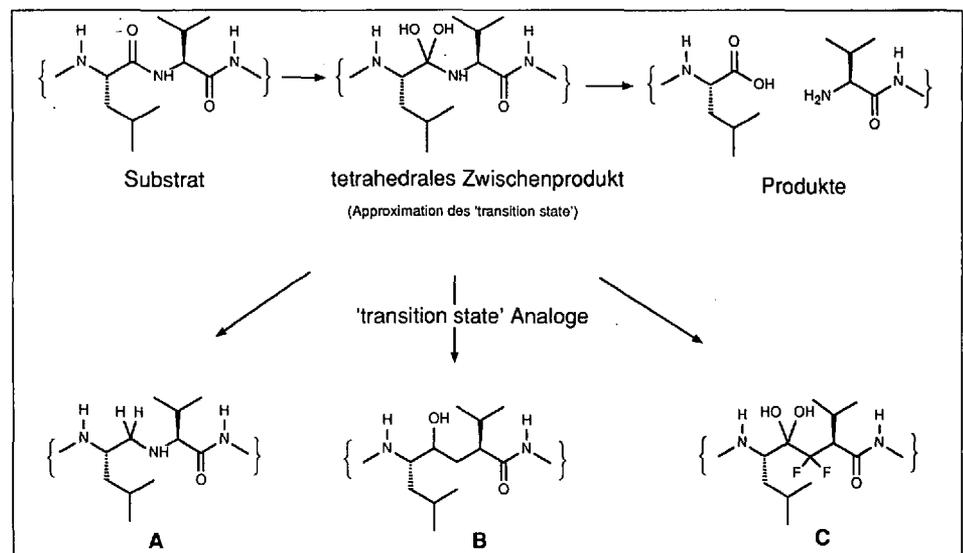
2. Das Konzept der 'transition-state' analogen Enzym-Hemmer

Für den Entwurf von potenten Enzym-Hemmern gleich welcher Art, hat das sich das Prinzip der 'transition-state'(TS)-Analoga vielfach bewährt und wird im folgenden kurz erläutert: Aus prinzipiellen Gründen kann davon ausgegangen werden, dass die TS-Struktur eine vielfach höhere Affinität zum Enzym haben muss als das Substrat oder die Produkte (vgl. Fig. 1), d.h. der Übergangszustand stellt eine ausgezeichnete 'Lead'-Struktur für den Medizinalchemiker dar. Allerdings ist für die meisten Reaktionen die Struktur des TS nicht bekannt und selbst bei einer relativ genauen Vorstellung davon, ist ein Übergangszustand als solcher natürlich nicht herstellbar. Die Kunst besteht darin, Moleküle zu entwerfen, die im Gegensatz zum TS stabil sind, aber trotzdem seine wesentlichen strukturellen Eigenheiten widerspiegeln (vgl. Schema 2). Praktisch wird meist folgendermassen vorgegangen: Es werden dem TS energetisch naheliegende, kurzlebige Zwischen-Produkte identifiziert, die strukturell noch soweit abgeändert werden, dass stabile, synthetisierbare Analoge resultieren. Diese Verbindungen werden dann anstelle des zu spaltenden Dipeptides in die Substrat-Sequenz eingebaut.

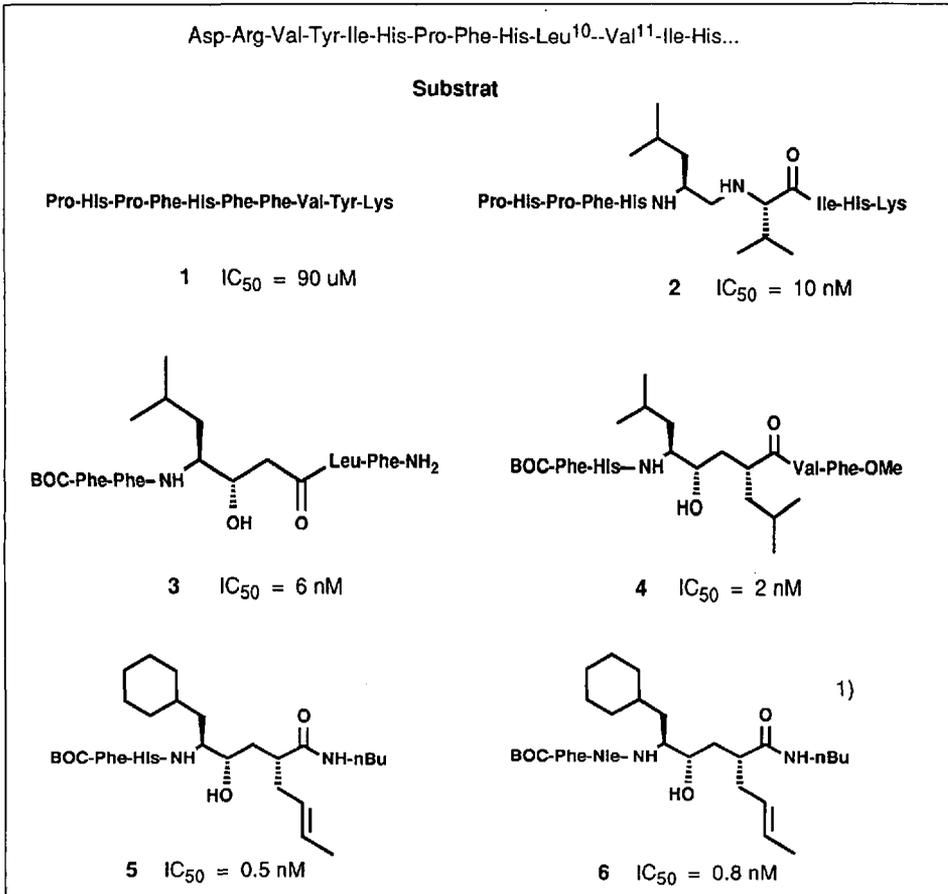
3. Pepstatin, die 'Lead'-Verbindung aus der Natur

Obwohl das Konzept der TS-Inhibitoren die Fortschritte auf dem Gebiet der Renin-Inhibitoren entscheidend beeinflusst hat, muss doch erwähnt werden, dass der Ausgangspunkt für einige Arbeitskreise die Naturstoffchemie war. Umezawa hat schon vor

Schema 2. Planung von TS-Analogen für Protease-Hemmer. Obschon die die genaue Lage des TS bei der Hydrolyse einer Amid-Bindung unbekannt ist, besteht doch wenig Zweifel, dass er entweder kurz vor oder nach der Bildung des tetrahedralen Zwischenprodukt überschritten wird, d.h. dieses kurzlebige Zwischenprodukt kann in erster Näherung als eine gute Approximation des Übergangszustandes angesehen werden. Da aber auch das Zwischenprodukt (ZP) nicht stabil ist, muss die Struktur noch weiter abgeändert werden, um zu einem herstellbaren Wirkstoff-Molekül zu kommen. Ein 'Trick' besteht z.B. darin, eines oder mehrere der Heteroatome im tetraedrischen ZP durch C-Atome zu ersetzen. So kommt man zur reduzierten Amid-Bindung A, dem Hydroxyethyl-Derivat B und, besonders bemerkenswert, zum hydratisierten Keton C. Bei der letzten Struktur erhöht die  $\alpha,\alpha$ -Difluor-Substitution die Elektrophilie in einem Ausmass, dass in wässr. Lsg. weitgehend die hydratisierte Form mit der geminalen Diol-Struktur des ZP vorliegt. Es fällt nicht schwer, eine ganze Reihe weiterer Vorschläge zusammenzustellen, die alle mehr oder weniger gute Mimetika für den TS sind.



Die erste Generation von 'transition state'-analogen Renin-Hemmern. Die angegebenen  $IC_{50}$ -Werte entsprechen der Konzentration der Substanzen, die bei pH 6.0 zu einer 50% Hemmung von gereinigtem Human-Renin führt, unter Verwendung eines synthetischen Tetradecapeptid als Substrat [34]. Dieser Assay wird von vielen Arbeitsgruppen eingesetzt. Trotzdem sollten jeweils die Originalarbeiten konsultiert werden, wenn  $IC_{50}$ -Werte aus verschiedenen Arbeiten miteinander verglichen werden, da die Testbedingungen variieren können. Häufig werden auch Daten für die Hemmung von ungereinigtem Plasma-Renin (also in Gegenwart von grossen Mengen von Plasmaproteinen) oder, vor allem in älteren Arbeiten, die Hemmung von Mäuserenin angegeben.  $K_D$ -Werte in dieser Arbeit sind Dissoziationskonstanten bei pH 7.4, bestimmt nach einem bei uns von *Evenou et al.* entwickelten Bindungsassay [35]. Diese  $K_D$ -Werte bei einem physiologisch relevantem pH-Wert können bis zu einer Grösseordnung schlechter (d.h. grösser) sein als die in saurem Milieu, dem pH-Optimum für Renin, gemessenen  $IC_{50}$ -Werte.



1) Norleucin (Nle) ist (S)-2-Aminohexansäure, ein Isomeres von Leucin.

die Erforschung des RAS-Systems, konnte doch mit deren Hilfe in ersten *in vivo* Experimenten die hypotensive Wirkung von Renin-Hemmern nachgewiesen werden, noch bevor wirksame, kleinmolekulare Hemmer zur Verfügung standen [9].

**4.2. 'Transition-state'-Analoge**

Der Durchbruch zu wirklich potenten und (relativ) kleinmolekularen Hemmern gelang erst *Selke et al.* mit Verbindungen die ein 'transition-state'-Analogon wie das reduzierte Amidisostere **2** in die Substrat-Sequenz eingebaut hatten [10]. In rascher Folge wurden dann Verbindungen vom Typ **3** bekannt, die Statin [7] und, als wirkungsvollste Variante davon, das 'Homostatin' [11] (vgl. **4**) enthielten. Diese Renin-Hemmer deckten etwa die Bindungsstellen von sechs Aminosäuren des Substrates ab, je drei zu beiden Seiten der zu spaltenden Amid-Bindung zwischen Leu<sup>10</sup> und Val<sup>11</sup>. Ein weiterer wichtiger Beitrag von *Boger et al.* [12] war die Entdeckung, dass eine Cyclohexylmethyl-Seitenkette anstelle der substratgerechten (i-Bu)-Gruppe des Leu<sup>10</sup> die Affinität der daraus gewonnenen Verbindungen drastisch steigern konnte. Diese Verbesserung war so gut, dass das C-terminale Di- oder Tripeptid in älteren Verbindungen durch eine einfache Alkylamino-Gruppe wie z.B. BuNH<sub>2</sub> ersetzt werden konnte, ohne dabei die nanomolare Dissoziationskonstante zum Renin zu opfern (vgl. **1-4** vs. **5**). Ebenfalls wurde schon bald klar, dass auch die restlichen Bindungsstellen durch andere Seitenketten, als sie im Substrat vorliegen, besetzt werden können. So werden anstelle von Histidin<sup>9</sup> auch Phenylalanin, Leucin, Norleucin,  $\gamma,\delta$ -ungesättigtes Norleucin und weitere

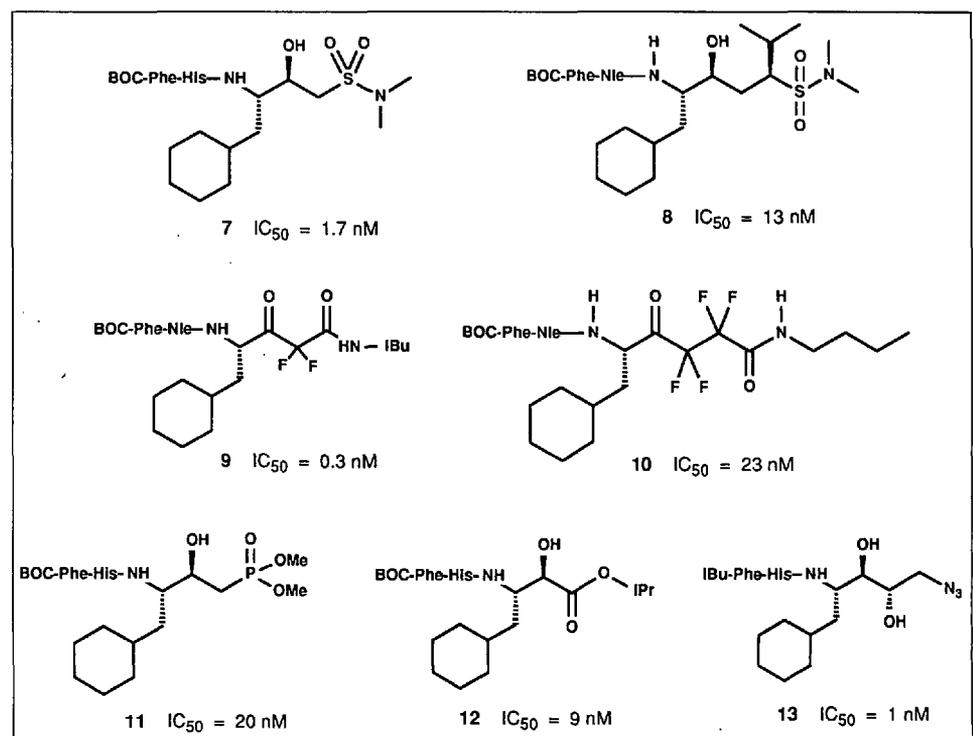
Jahrzehnten Pepstatin aus Fermentationsbrühen von Actinomyceten isoliert [5]. Es ist ein äusserst potenter Inhibitor ( $IC_{50} < 10^{-9} M/l$ ) für Pepsin, einer Aspartylprotease aus dem Verdauungstrakt. Renin selbst wird von Pepstatin erst im mikromolaren Konzentrationsbereich gehemmt. Ein Vergleich der Struktur von Pepstatin mit dem Renin-Substrat zeigt allerdings schnell, wo Verbesserungen möglich sind (vgl. Fig. 2). *Boger et al.* konnten in ihrer Pionierarbeit [6] zeigen, dass schon der Ersatz des Val-Val-Dipeptides am Aminoterminus durch das substratgerechte Phe-His die Potenz der Hemmer rasch in den nanomolaren Bereich bringt.

**4. Renin-Inhibitoren**

**4.1. Frühe Renin-Inhibitoren**

Die ersten Renin-Inhibitoren mit hoher Affinität zum Enzym waren mono- und polyklonale Antikörper gegen Renin [7] sowie einfache Substrat-Analoga wie **1** [8]. Die Antikörper, obwohl sicher nie als therapeutisch einsetzbare Antihypertensiva gedacht, erwiesen sich als wertvolle Werkzeuge für

Die 'neuen' Hemmprinzipien. Die wenigen Beispiele zeigen die grosse strukturelle Vielfalt, die am C-terminalen Ende 'erlaubt' ist. Nicht immer geben die 'richtigen' Isostere, d.h. die mit der korrekten Anzahl von 'backbone'-Atomen, die besten Hemmer. Vgl. z.B. **7** und **9** mit **8** bzw. **10**.



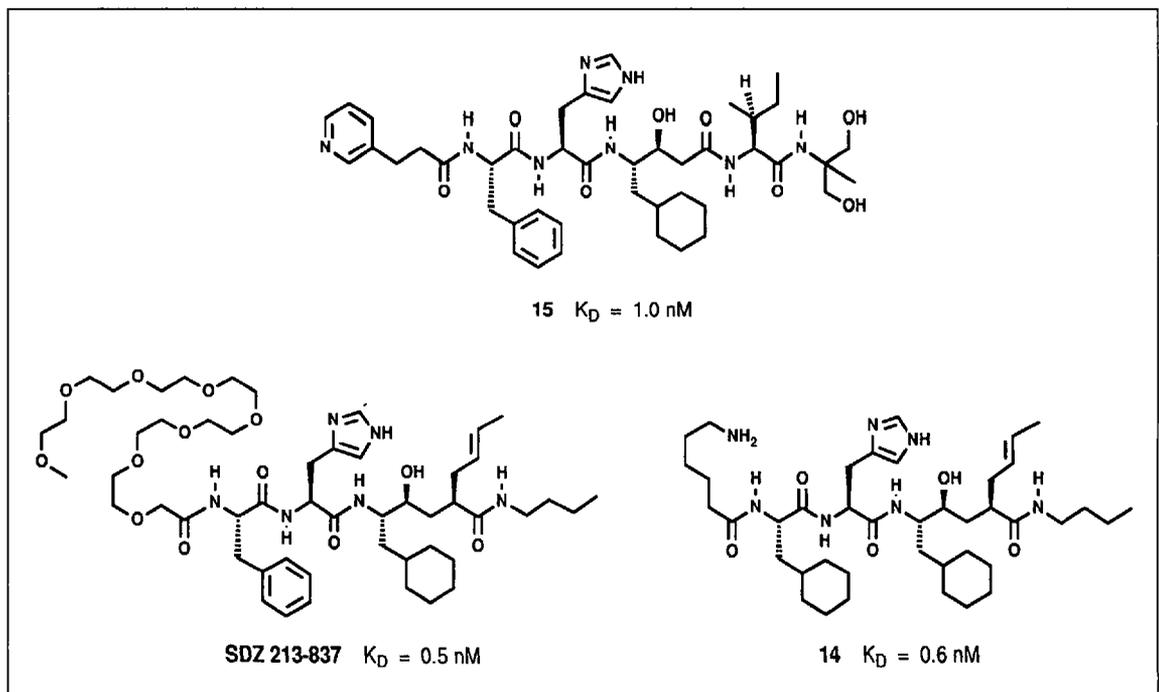
Aminosäuren toleriert (vgl. 3 und 6). Genauso kann die (i-Pr)-Seitenkette von Valin<sup>11</sup> durch eine ganze Reihe von bevorzugt hydrophoben Substituenten wie Me, Pr, Bu, Butenyl, Ph *etc.* ersetzt werden (vgl. 4-6 vs. 2). Wie weiter unten beschrieben (Kap. 4.5), hat diese überraschend grosse Toleranz des Renins bei der Planung von nichtpeptidischen Hemmern eine wichtige Rolle gespielt.

Diese raschen Fortschritte zeigten einerseits eindrücklich wie erfolgreich das Konzept der 'transition-state'-analogen Enzym-Hemmer eingesetzt werden konnte. Andererseits bearbeiteten, ausgehend von diesem Konzept, praktisch alle Arbeitsgruppen auf diesem Gebiet (viele davon naturgemäss in der Pharmaindustrie) die gleichen, oben er-

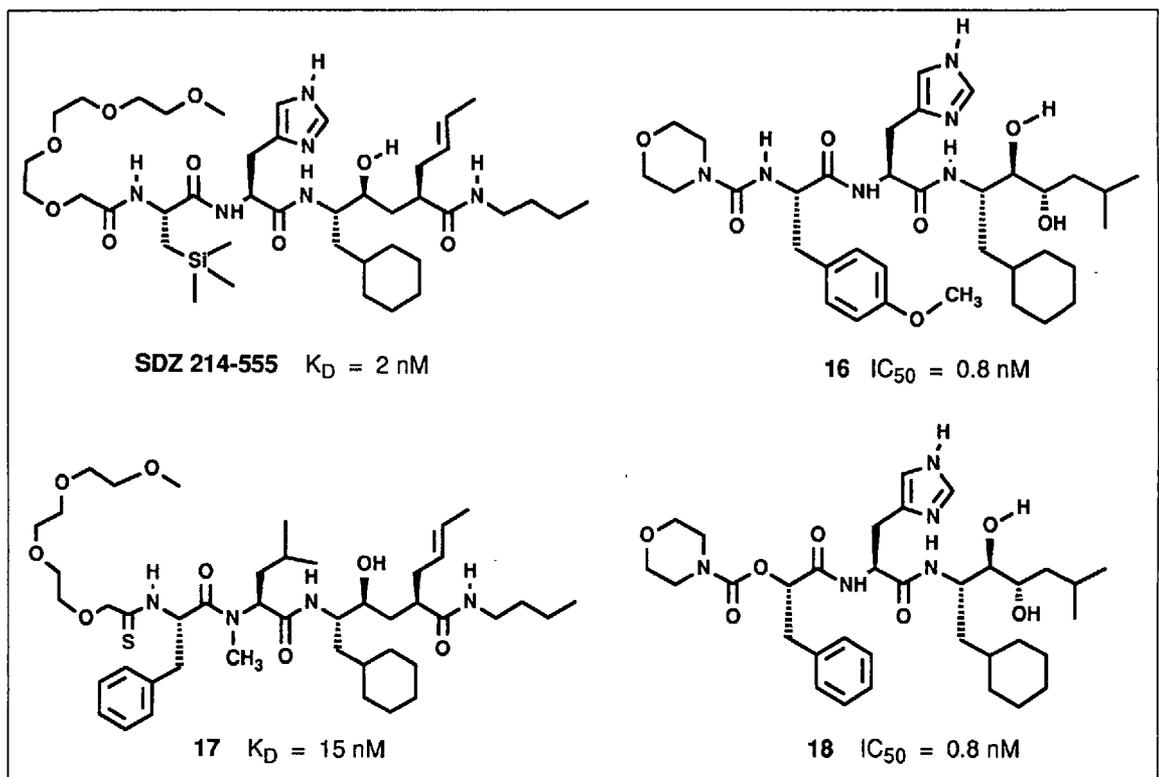
wähnten 'Lead'-Verbindungen. Wohl nicht zuletzt deshalb wurden in der Folge Dutzende von neuen TS-Analogen insbesondere auch in der Patentliteratur beschrieben [13]. Eine kleine Auswahl sind 7-13. Es fällt auf, dass praktisch alle Verbindungen die erwähnte Cyclohexylmethyl-Seitenkette aufweisen und am C-terminalen Ende, das für eine starke Bindung am Renin offenbar weniger wichtig ist, modifiziert sind.

Der Optimismus, der durch die schnellen Fortschritte in Planung und Synthese von äusserst potenten und dabei hochselektiven Hemmern geweckt wurde, machte in allen Labors grosser Ernüchterung Platz, sobald die neuen Verbindungen auf ihre Wirkung *in vivo* untersucht wurden. Diese erste Generation von TS-Renin-Hemmer

waren nicht nur sehr schwer wasserlöslich und damit für die Pharmakologie schwierig handhabbar, sondern zeigte kaum eine der beschriebenen Verbindungen eine signifikante Wirkung, wenn sie *oral* verabreicht wurde (Aktivität bei oraler Applikation ist für einen antihypertensiven Wirkstoff fast eine Grundvoraussetzung!). *Intravenös* appliziert hemmten viele Verbindungen zwar die Plasma-Renin-Aktivität (PRA) und senkten den Blutdruck, die Halbwertszeiten dieser Effekte betrug aber oft nur wenige min. All diese negativen Eigenschaften wurden mit der peptidartigen Natur dieser Substanzen in Verbindung gebracht. Es hat in der Folge nicht an Anstrengungen gefehlt, diese Probleme durch entsprechende strukturelle Modifikationen zu lösen.



**Wasserlösliche Reninhemmer.** Nur drei Beispiele anstelle der vielen Dutzend in [36] beschriebenen, hydrophilen Modifikationen des *N*- wie auch des *C*-Terminalen. Die grosse Variabilität, die hier möglich ist, ohne einen wesentlichen Einfluss auf die Bindung ans Renin zu haben, lässt den Schluss zu, dass diese Stellen schon praktisch ausserhalb der 'active site' zu liegen kommen.



**Chymotrypsin resistente Renin-Hemmer.** Wie die Beispiele zeigen, ist es relativ einfach, gegen Chymotrypsin resistente, aber dabei doch sehr potente Renin-Hemmer zu entwerfen. Der Grund liegt darin, dass die Modifikationen rund um den kritischen Phenylalanin-Rest bei Chymotrypsin unmittelbar vor der zu spaltenden Amidbindung zu liegen kommen (der sogenannten  $P_1$ -Bindungsstelle). Bei Renin kommt die modifizierte Aminosäure aber an die  $P_3$ -Bindungsstelle zu liegen, also viel weiter weg von der 'active site', wo die strukturellen Bedingungen für eine gute Bindung offenbar weniger genau definiert sind.

**4.3. Wasserlösliche Renin-Hemmer**

Aspartylproteasen spalten Peptid-Bindungen bevorzugt zwischen hydrophoben Aminosäuren; Human-Renin zwischen Leucin und Valin. Zwangsläufig erhält man mit TS- und Substratanalogen Hemmern auch stark hydrophobe Moleküle. Es hat sich jedoch gezeigt, dass sich sowohl das C- wie auch das N-terminale Ende der Blocker durch hydrophile Reste modifizieren lassen, ohne dabei die Affinität zum Enzym zu kompromittieren (vgl. 14, 15 und SDZ 213-837). Viele der so erhaltenen Substanzen sind, im Gegensatz zu älteren Verbindungen, ohne weitere Hilfsmittel in H<sub>2</sub>O bei physiologischen pH-Werten löslich. Leider wurde die oben erwähnte ungünstige Pharmakokinetik durch die veränderten physikochemischen Eigenschaften nur teilweise verbessert. Insbesondere konnte mit kaum einem dieser hydrophilen Hemmer eine signifikante orale Aktivität nachgewiesen werden.

**4.4. Chymotrypsin-resistente Renin-Hemmer**

Die Suche nach den Gründen für die schlechte 'Bioverfügbarkeit' hat schon bald einen gemeinsamen Schwachpunkt aller Renin-Hemmer zu Tage gefördert [14]: Die 'traditionellen' Renin-Hemmer enthielten praktisch immer Dipeptide wie Phe-His oder Phe-Nle als Bausteine (vgl. 1-6 und 7-13). Es überrascht eigentlich nicht, dass diese Phenylalanin enthaltenden Peptide gute Substrate für  $\alpha$ -Chymotrypsin sind, einer wichtigen Protease des Verdauungstraktes (Schema 3). Diese rasche Abbaubarkeit ist in Zusammenhang mit der schlechten oralen Aktivität gebracht worden. Konsequenterweise wurde darauf eine ganze Generation von Chymotrypsin-resistenten Renin-Hemmer synthetisiert. Es genügte, das Phenylalanin<sup>8</sup> in der Substrat-Sequenz durch ein geeignetes 'Bio-Isosteres' zu ersetzen. Beispiele sind (Trimethylsilyl)alanin [15] und O-Methyltyrosin [16]. Auch die N-Methylierung der Amid-Bindung zwischen Phe-His oder Phe-Nle oder der Ersatz der Amino-Gruppe des Phenylalanins [17] ergaben gegen  $\alpha$ -Chymotrypsin weitgehend stabile, aber immer noch sehr potente Renin-Hemmer (vgl. SDZ 214-555 und 16-18).

Diese Verbindungen waren weitgehend gegen den Abbau durch proteolytische Enzyme geschützt, weil auch das C- und N-

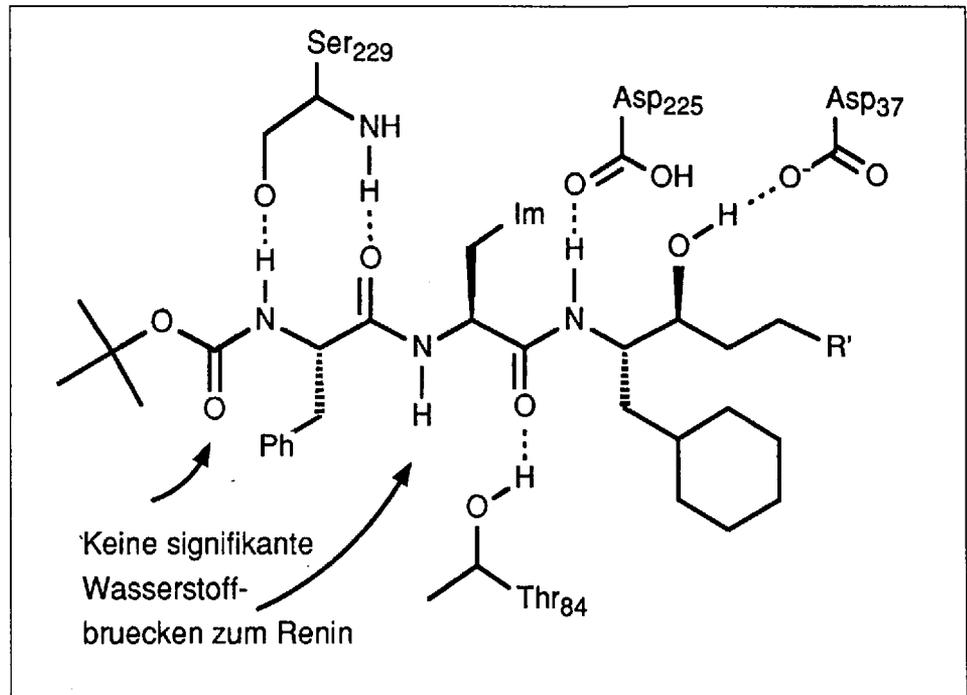


Fig. 3. Wechselwirkung eines Renin-Hemmers mit Renin. Vedani's YETY-Programm [18] ist besonders geeignet um ein Netz von H-Brückenbindungen zu optimieren. Es berücksichtigt nicht nur deren Länge, sondern am Exklusivität auch die ausgeprägte Richtungsabhängigkeit dieser Art von Wechselwirkungen. Natürlich werden gleichzeitig auch die Van-der-Waals-Interaktionen optimiert.

terminale Ende derivatisiert und damit dem 'Zugriff' von Exopeptidasen entzogen war. Intravenös verabreicht zeigten viele dieser Hemmer wie z.B. SDZ 214-555 eine ausgeprägte und langanhaltende Blutdrucksenkung sowie eine vollständige Hemmung der PRA. Die Enttäuschung war (wohl nicht nur in unserer Arbeitsgruppe) gross, dass trotz diesen weiteren Verbesserungen immer noch praktisch keine orale Aktivität nachzuweisen war. Es setzte sich immer mehr die Ansicht durch, dass nicht nur die metabolische Instabilität eine grosse Hürde für die orale Wirksamkeit ist, sondern dass der peptidische Charakter per se einer effektiven Resorption aus dem (Magen/Darm)-Trakt im Wege steht, auch wenn (biochemisch) völlig stabile Wirkstoff-Moleküle vorliegen. Gesucht waren also Strukturvorschläge die zu nichtpeptidischen Renin-Hemmern führten.

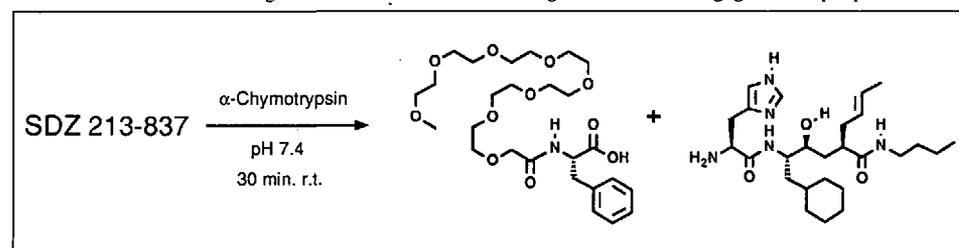
**4.5. Nichtpeptidische Hemmer**

Für den rationalen Entwurf von nichtpeptidischen Hemmern, also von Verbindungen, die keine  $\alpha$ -Aminosäuren mehr enthalten, standen bei uns am Anfang 'molecular-modelling'-Studien über die Art der

Wechselwirkung der peptidischen Hemmer mit dem Enzym im Vordergrund. Für das Renin wurde dabei eine aufgrund der X-Ray-Koordinaten von Rhizopuspepsin modellierte Struktur verwendet. Die Inhibitoren wurden mit dem SYBYL-Programm modelliert und am Bildschirm manuell in die 'active site' des Renin-Modelles eingepasst. Jeder Komplex wurde anschliessend durch das Molecular-Mechanics-Program YETY [18] optimiert. Das Ergebnis dieser Arbeiten ist schematisch in Fig. 3 wiedergegeben [19]. Weder für die N-Acyl-Gruppe des Phenylalanins<sup>8</sup> noch für die NH-Gruppe der Amid-Bindung zwischen Phe<sup>8</sup> und His<sup>9</sup> konnten eine Interaktion mit dem Enzym gefunden werden. Unsere Bemühungen konzentrierten sich deshalb vor allem darauf, Dipeptid-Mimetika zu finden, in welchen diese Amid-Bindung durch ein entsprechendes Isosteres ersetzt ist. Die 'molecular-modelling'-Hypothesen konnten voll bestätigt werden. Ketomethylen-, Sulfomethylen- und Hydroxyethylen-Isostere – in allen ist die im Substrat vorhandene NH-Gruppe durch eine CH<sub>2</sub>-Gruppe ersetzt – ergeben in Kombination mit einem TS-Analogon Renin-Hemmer mit nanomolarer Affinität, ohne eine einzige  $\alpha$ -Aminosäure!

Auch die N-Acylgruppe des Phenylalanins kann ersetzt (SDZ 214-910) oder verschoben (SDZ 217-193) werden, ohne dass die Affinität zu Renin wesentlich vermindert wird. Weiter haben wir uns die schon oben beschriebene Struktur-Aktivitätsbeziehung zu Nutze gemacht, und aus synthetischen Gründen vorerst gar nicht versucht, ein Phe-His Isosteres mit den 'korrekten' Seitenketten herzustellen [20]. Statt dessen liegt den Hemmern 214-910 und 217-172 eine, bis auf die Schutzgruppen und den Oxidationszustand, translationssymmetri-

Schema 3. Inaktivierung eines Renin-Hemmers durch  $\alpha$ -Chymotrypsin. SDZ 213-837 wurde in wenig MeOH gelöst und zu einer gepufferten Lsg. von 1 mg  $\alpha$ -Chymotrypsin/ml (von Sigma) gegeben. Nach 30' wurde das Enzym mit Aceton gefällt, der Überstand filtriert und eingedampft. Im Rückstand konnte durch MS keine Spur mehr von 213-837 mehr nachgewiesen werden. Statt dessen liegen nur mehr die angegebenen Spaltprodukte vor.



'Nichtpeptidische' Renin-Hemmer. Wie erwähnt fällt bei den Hemmern SDZ 214-910 und SDZ 217-172 die translationssymmetrische Struktur auf. SDZ 217-172 ist im Gegensatz zu den weiter oben stehenden gut wasserlöslich und oral eine der aktivsten Verbindungen, die wir je geprüft haben. In Fig. 4 sind die Daten der Testierung dieser Substanz an wachen Totenkopffischen festgehalten. Interessant ist die Entstehungsgeschichte von ICI's Renin-Hemmer 20 [37]. Eine grössere Anzahl Arylessigsäuren wurden mit einem TS-Analogen kombiniert. Die beste Verbindung aus diesem 'semi-random Screening' wurde dann weiter zur Verbindung 20 optimiert. CGP 38560 war einer der ersten Renin-Hemmer, die nur noch Histidin als einzige  $\alpha$ -Aminosäure enthielten und gehört zu den am besten untersuchten Hemmern, über die berichtet wurde. Sogar klinische Studien wurden damit durchgeführt, wenn auch mit enttäuschenden Resultaten [39].

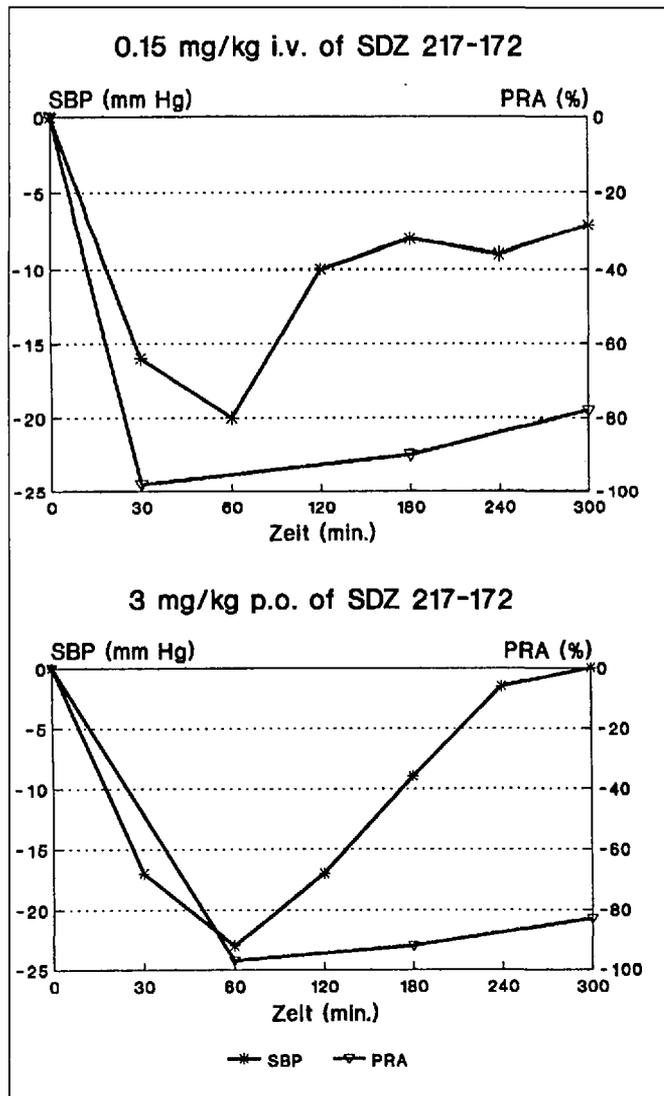
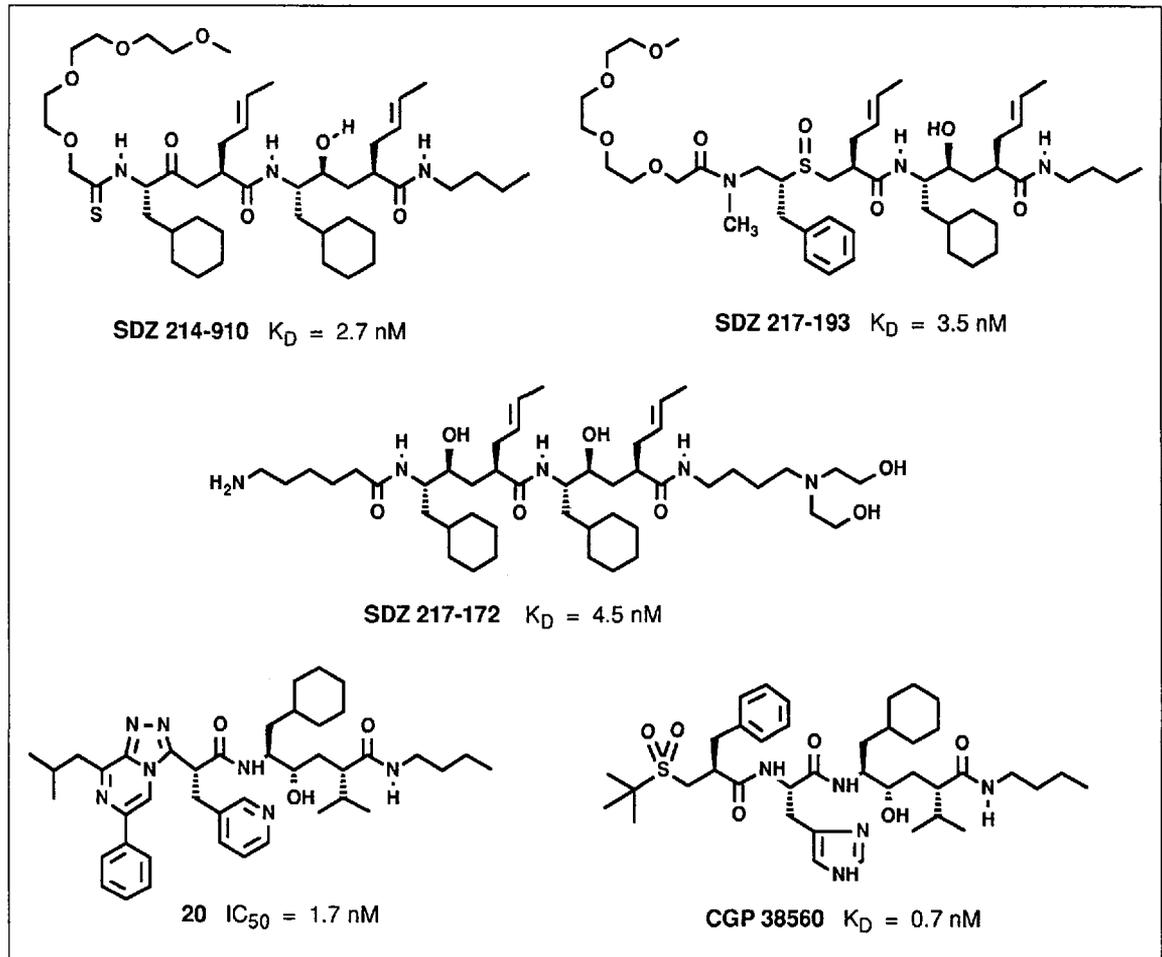


Fig. 4. In-vivo Aktivität von SDZ 217-172. Dosen von 0.15 mg/kg (intravenös) oder 3 mg/kg (per oral) wurden wachen Totenkopffischen verabreicht, die mit dem Diuretikum Furosemide (50 mg/kg) vorbehandelt wurden. PRA und systolischer Blutdruck (SBP) wurden während 5 h verfolgt und sind im Diagramm als prozentuale Änderung zum Ausgangswert aufgetragen. Nur Tiere mit einer PRA von  $\geq 10 \text{ ng All/m/h}$  (nach Furosemide-Behandlung) wurden für die Auswertung berücksichtigt. Man beachte die im späteren Versuchsverlauf auftretende Diskrepanz zwischen PRA und Blutdrucksenkung.

sche Struktur zu Grunde, was die Synthese entscheidend vereinfacht. Wie weiter oben besprochen, sind auch in diesen Verbindungen N- und C-terminale Schutzgruppen so gewählt, den Blockern optimale physikalisch-chemische Eigenschaften zu verleihen. Zwei weitere Verbindungen dieser Generation sind CGP 38560 (Ciba-Geigy) und 20 (ICI) mit mehr bzw. weniger peptidischem Charakter. Mit diesem Hemmer-Typ, insbesondere SDZ 217-172, ist es uns erstmals gelungen, nicht nur eine gute Blutdrucksenkung und PRA-Hemmung nach i.v. Applikation, sondern auch eine signifikante und reproduzierbare Wirkung nach oraler Gabe nachzuweisen. Die 'Bioverfügbarkeit', gemessen am Effekt, ist allerdings noch relativ bescheiden und liegt bei ca. 5% (vgl. Fig. 4).

### 5. Synthese der Renin-Hemmer

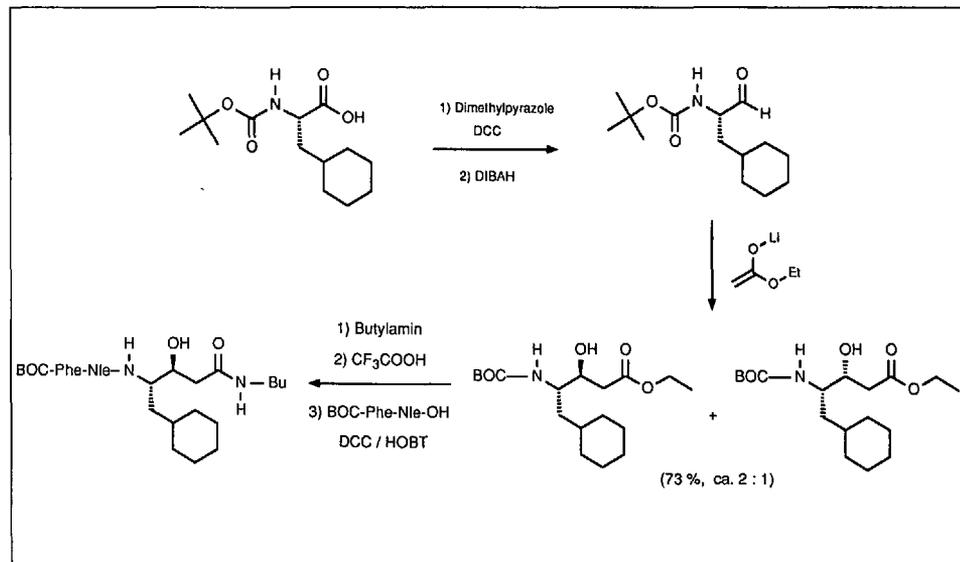
Im folgenden werden einige synthetische Aspekte insbesondere beim Aufbau der verschiedenen 'transition-state'-Analogen behandelt. Experimentelle Einzelheiten finden sich in den zitierten Literaturstellen. Für neue, bei uns erstmals hergestellte Verbindungen, sind Veröffentlichungen mit experimentellen Teil in Vorbereitung.

#### 5.1. Statine

Die in den folgenden Schema für die Cyclohexylmethyl-Derivate angegebenen Synthese-Wege können problemlos auf andere Aminosäuren wie Leucin oder Phenylalanin übertragen werden. Das durch

katalytische Hydrierung (Rh auf Alox) von *N*-Boc-Phenylalanin leicht zugängliche *N*-Boc-Cyclohexylalanin wird mit 3,5-Dimethylpyrazol und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) ins entsprechende Pyrazolid übergeführt. Reduktion mit Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAH) und vorsichtige Hydrolyse mit verdünnter HCl führt selektiv zum *N*-Boc-Aminoaldehyd, der wegen Racemisierungsgefahr ohne weitere Reinigung mit dem Lithium-enolat von Essig-ester umgesetzt wird. Das daraus resultierende (2:1)-Diastereoisomerengemisch der geschützten Statine kann durch Chromatographie an Kieselgel leicht getrennt werden. Wie in *Schema 4* angegeben, können diese Zwischenprodukte in einfacher Weise in eine geeignete Substratsequenz eingebaut werden: Aminolyse des Esters mit einem geeigneten Amin, Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit CF<sub>3</sub>COOH und Acylierung der freien Amino-Gruppe mit dem gewünschten Dipeptid (oder Dipeptid-Ersatz) z.B. Boc-Phe-Nle-OH unter Verwendung von DCC und Hydroxybenzotriazol (HOBT) [21]. Unter diesen Bedingungen wird keine oder, bei Histidin enthaltenden Peptiden, nur eine sehr geringe ( $\leq 5\%$ ) Racemisierung der aktivierten Aminosäure beobachtet.

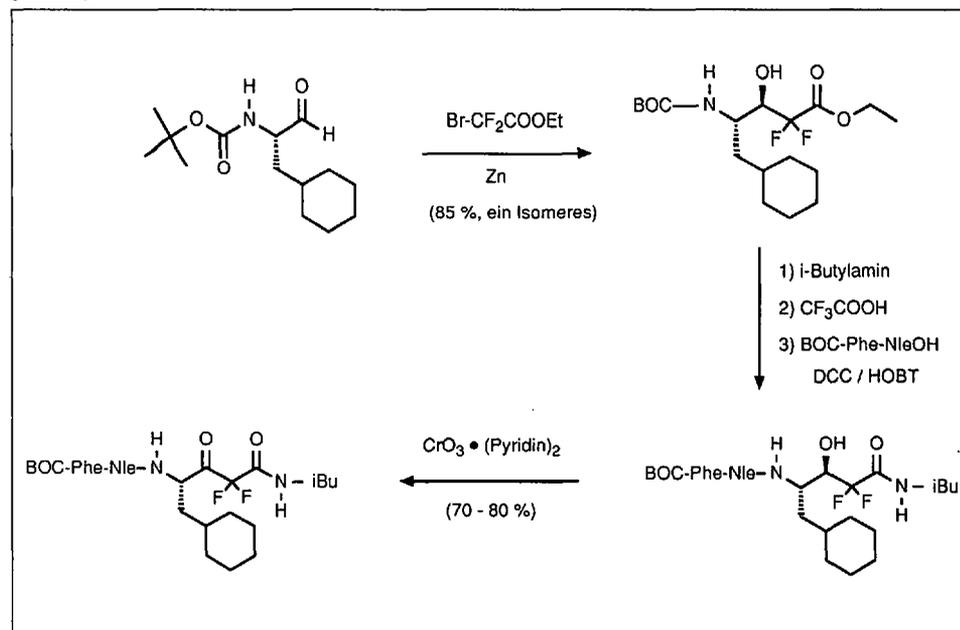
Schema 4



5.2. Difluorstatone

Die Herstellung der Difluorstatone (*Schema 5*) folgt im Prinzip den nichthalogenierten Verbindungen. Anstelle des Lithium-enolates von Essig-ester wird jedoch das *Reformatsky*-Reagens aus Bromodifluoroessigsäure-ethylester und aktiviertem Zn in siedendem THF eingesetzt [22]. Interessanterweise entsteht in diesem Fall praktisch nur ein Diastereoisomeres. Der Difluoroalkohol wird auf die gleiche Art wie in *Schema 4* in die gewünschte Substrat-Sequenz eingebaut. Zuletzt erfolgt die nicht immer leichte Oxidation des Statins zum Staton. Besonders bewährt haben sich dabei *Collin's* Reagens, CrO<sub>3</sub>·2Pyridin [23], DMSO aktiviert mit DCC/Cl<sub>2</sub>CHCOOH [24] oder *Dess Martin's* Reagens [25].

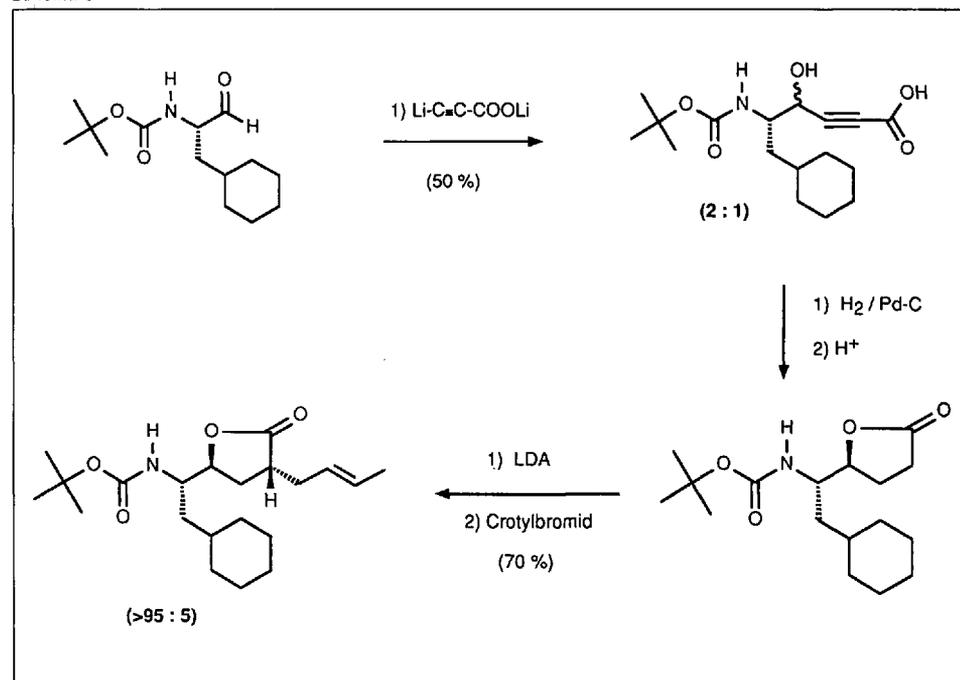
Schema 5



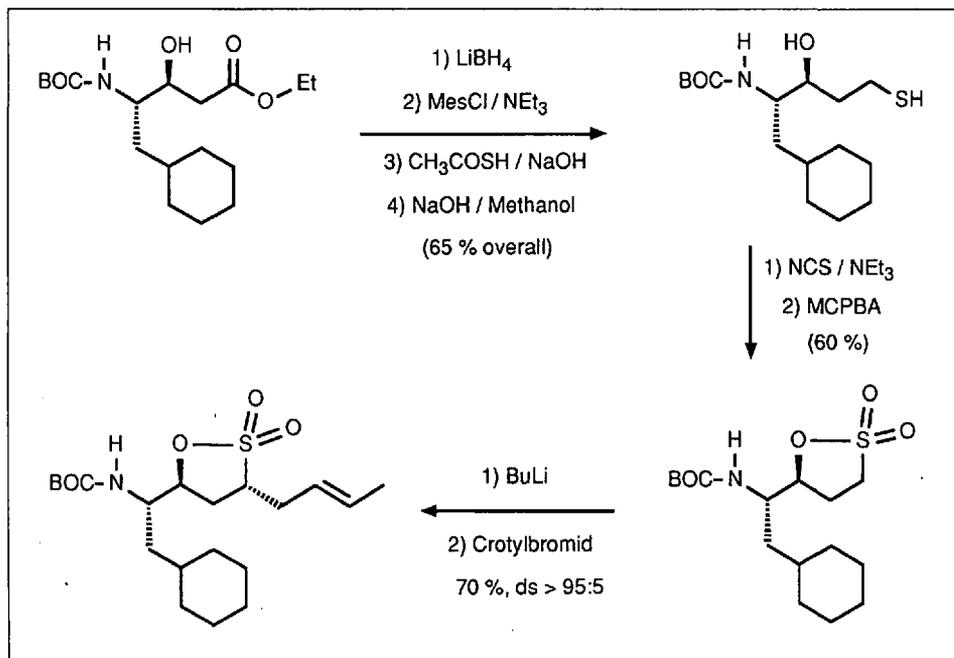
5.3. Hydroxyethylen Isostere ('Homostatine')

Eine gute Übersicht über die zahlreichen bis jetzt beschriebenen Synthesen von Hydroxyethylen-Isosteren findet sich in [26]. Wir haben den in *Schema 6* beschriebenen Weg gewählt und damit problemlos 100 g Mengen der entsprechenden Verbindungen herstellen können. Das schon in *Schema 4* erwähnte *N*-Boc-Cyclohexylmethylalaninal wird mit dem Dilithium-Derivat von Propiolsäure als Homo-enolat-Äquivalent [27] umgesetzt. Hydrierung des Adduktes und säurekatalysierte Cyclisierung liefert das Lacton als (3:1)-Diastereoisomerengemisch zugunsten des gewünschten (4*S*)-Isomeren. Dieses kann mit Lithium-diisopropylamid (LDA) ins Dianion übergeführt werden, das mit ausgezeichneter *trans*-Diastereoselektivität (>95:5), mit z.B. mit Crotyl-bromid, alkyliert werden kann. Allerdings ist kom-

Schema 6



Schema 7



merziell erhältliches (*E*)-Crotyl-bromid mit 10–20% des (*Z*)-Isomeren verunreinigt. Ein bezüglich der Konfiguration der (C=C)-Bindung einheitliches Produkt wird mit (*E*)-Crotyl-triflat erhalten, das sich *in situ* aus Crotyl-alkohol, BuLi und Trifluormethansulfonsäure-anhydrid erzeugen lässt. Ein Nachteil dieses Synthese-Weges ist, dass nur Seitenketten eingeführt werden können, die sich von reaktiven Alkylierungsmittel wie MeI oder Allyl- und Benzyl-halogeniden ableiten. Der Einbau in eine Substrat-Sequenz erfolgt dann genau gleich wie in *Schema 4* beschrieben.

**5.4. Sulfonsäure-Analoga der Hydroxyethyl-Isosteren ('Sulfohomostatine')**

Zur Synthese dieses Sulfonsäure-Analogons (*Schema 7*) der Homostatine kann das nach *Schema 4* hergestellte Cyclohexylmethyl-'statin' verwendet werden. Reduktion der Ester-Gruppe, selektive Mesylierung und Substitution der primären OH-Gruppe durch das Na-Salz der Thioessigsäure liefert nach basischer Abspaltung der Ac-Gruppe stereochemisch einheitliches Hydroxythiol. Letzteres kann mit *N*-Chlorosuccinimid (NCS) unter basischen Bedingungen zum Sulfensäure-ester cyclisiert und mit *m*-Chloroperbenzoesäure (MCPBA) weiter zum Sulfensäure-ester oxidiert werden. Die weiteren Stufen entsprechen genau dem in *Schema 6* beschriebenen Verfahren. Das Dilithio-Derivat kann jedoch direkt mit BuLi (anstelle von LDA) hergestellt werden.

**5.5. Tetrafluoro-ketomethylen-Isostere (Tetrafluoro-'Homostatone')**

Die in *Schema 8* beschriebene elektrochemische Synthese unter Verwendung des in *Schema 5* beschriebenen *N*-Boc-Difluorostatins als Kupplungskomponente in einer gemischten Kolbe-Elektrolyse verläuft zwar nur mit sehr mässiger Ausbeute [28]. Die Kürze des Verfahrens stellt aber im

Labormasstab trotzdem eine wertvolle Alternative zu einer beschriebenen 'multistep'-Synthese [29] dar. Wie bei allen  $\alpha$ -Difluoroketon enthaltenden Renin-Hemmern wird auch hier am besten der Fluoroalkohol in die gewünschte Substrat-Sequenz eingebaut und erst ganz am Schluss zum aktiven Keton oxidiert.

**5.6. Synthese der nichtpeptidischen Renin-Hemmer**

Wie schon erwähnt wurde, liegen der Planung der nichtpeptidischen Renin-Hemmer auch Überlegungen bzgl. synthetischer Zugänglichkeit zugrunde [30]. Der Vorteil der gewählten *Translationssymmetrie* der Zielmoleküle kommt im *Schema 9* zum Ausdruck: Ein gemeinsames Ausgangsmaterial (s. *Schema 6*) wird zur einen Hälfte in eine *N*- und *O*-geschützte Säure und zur andern in ein *C*-terminal geschütztes Amin umgewandelt. Die Kupplung der beiden Komponenten mit DCC/HOBT ergibt mit Ausnahme der Schutzgruppen die Wirkstoff-Moleküle.

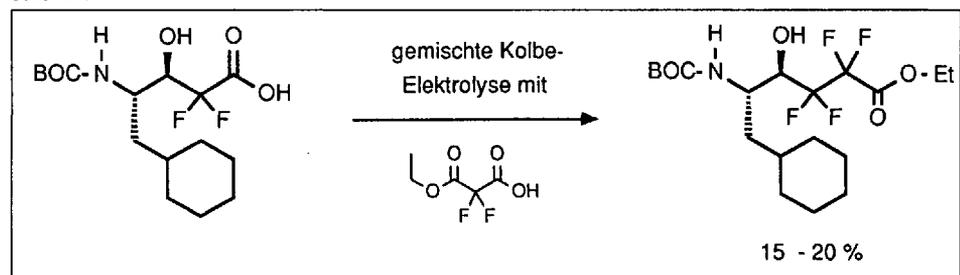
**6. In-vivo-Aktivität von Renin-Inhibitoren**

Im Gegensatz zu den von Anfang an ergebigen chemischen und biochemischen Ansätzen für die Entwicklung eines Renin-

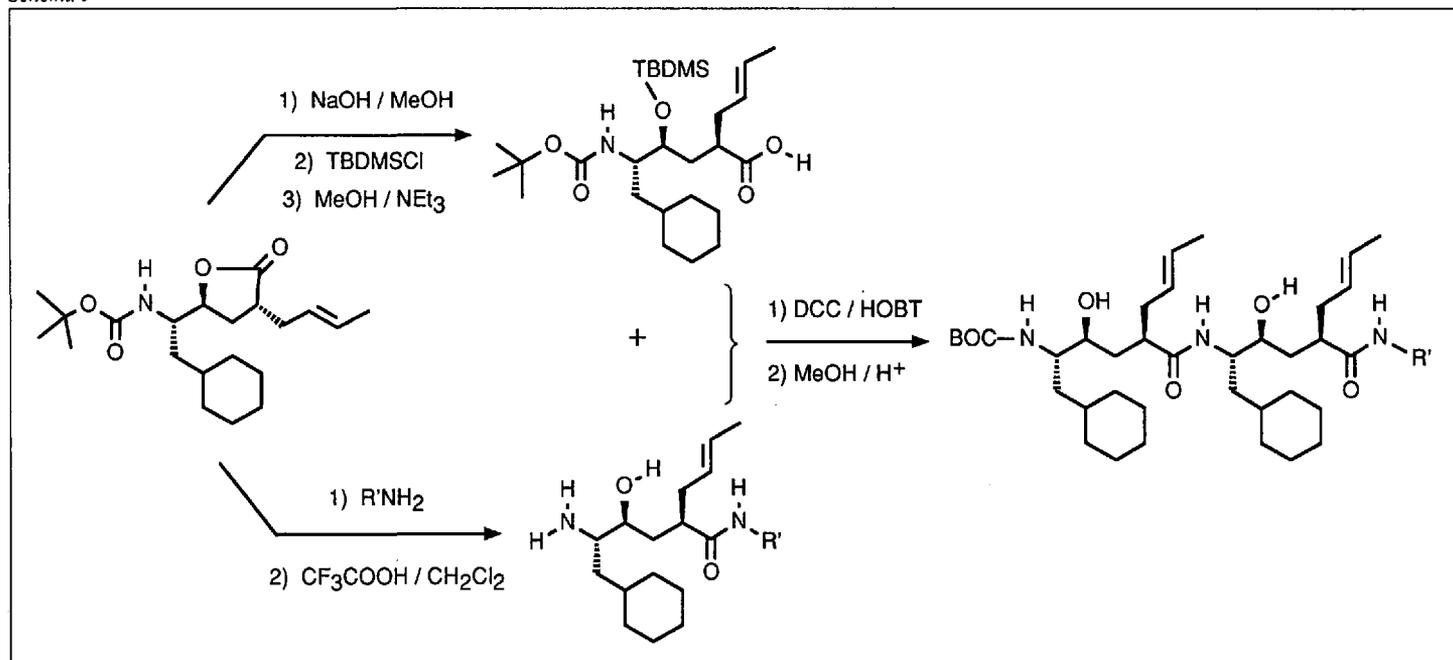
Hemmers hatte die Pharmakologie einen ungleich schwereren Stand. Die Probleme begannen schon bei der Suche nach einem geeigneten Tiermodell: Es hatte sich gezeigt, dass z.B. *Ratten*-Renin durch viele für *Human*-Renin optimierte Hemmer nur noch wenig oder gar nicht mehr gehemmt wird. Das bedeutete, dass bei diesen, von Kreislaufpharmakologen bevorzugten Tieren, der Einfluss eines Renin-Hemmers auf den Blutdruck nur bei gleichzeitiger Infusion von Human-Renin bestimmt werden konnte. Reines Human-Renin war aber, bevor gentechnologisch hergestelltes zur Verfügung stand, nur in sehr beschränkten Mengen zugänglich. Viele Arbeitsgruppen bevorzugten deshalb bald *Primaten* wie Marmosets [31], Totenkopf- oder Rhesusaffen [32], weil deren Renin durch die 'massgeschneiderten' Humanrenin-Hemmer meist ähnlich stark blockiert wurde wie das menschliche. Diese Tiere sind aber nicht nur um ein Vielfaches aufwendiger in der artgerechten Haltung als Nager, sondern auch nicht in beliebiger Anzahl verfügbar. Zudem müssen sie vor den Versuchen kochsalzarm ernährt oder zur Ausscheidung des NaCl mit einem Diuretikum vorbehandelt werden. Dadurch wird der Blutdruck stark vom RAS abhängig. Eine Hemmung des Renins in diesem Zeitpunkt führt zu einer messbaren Blutdrucksenkung, obwohl die Tiere einen normalen Blutdruck aufweisen. Während der Versuche können bei grösseren Primaten auch Plasmaproben genommen und so die PRA gemessen werden. Dabei trat bei vielen Hemmern ein unerwarteter Effekt auf: Obwohl die PRA oft für viele Stunden praktisch vollständig gehemmt war, stieg der Blutdruck nach einer gewissen Zeit wieder auf den Kontrollwert vor dem Versuch an (s. *Fig. 4*). Dieser Befund hat die Frage nach einem für den Blutdruck relevanten 'Gewebe'-Renin aufgeworfen, das bis heute Gegenstand kontroverser Ansichten ist.

Mit dieser Methode haben wir an Totenkopffäffchen und Rhesusaffen über hundert Renin-Hemmer geprüft. Das Ergebnis ist leicht zusammenzufassen: Die meisten Verbindungen zeigen nach *i.v.* Applikation eine deutliche, mehr oder weniger lang andauernde PRA-Hemmung und meistens, aber nicht immer, auch eine Blutdrucksenkung. Aber nur mit Hemmern aus der 'nichtpeptidischen' Klasse wie z.B. **SDZ 217-172** konnten reproduzierbare Effekte nach *oral*er Verabreichung (mittels Magensonde)

Schema 8



Schema 9



beobachtet werden. Wie aus der Gegenüberstellung in Fig. 4 ersichtlich ist, wird für die gleiche Wirkung aber immer noch rund die zwanzigfache Menge der intravenösen Dosis benötigt.

## 7. Schlussfolgerungen

Die jetzt schon rund ein Jahrzehnt dauernden Anstrengungen vieler Forschungsgruppen (zum grossen Teil aus der Pharmaindustrie), klinisch brauchbare Renin-Hemmer zu entwickeln, hat bis jetzt folgende Ergebnisse gebracht:

Es hat sich gezeigt, dass mit dem Konzept der 'transition state'- und Substrat-analogen Proteasehemmer in kurzer Zeit äusserst potente und selektive 'Lead'-Verbindungen generiert werden können. Naturgemäss sind diese Substanzen aber peptidartige Verbindungen mit all den vorgängig beschriebenen Nachteilen. 'Gewöhnliche' Peptide sind in vielen Fällen ganz einfach zu 'soft' für eine breite, insbesondere orale Applikation. Diese Nachteile durch entsprechende chemische Modifikationen zu verbessern hat sich als die weit schwierigere Aufgabe herausgestellt, als die ersten Peptid-'Leads' zu finden.

Tatsächlich war bis jetzt eine orale Wirksamkeit an Primaten nur dann nachweisbar, wenn den Testsubstanzen der Peptidcharakter weitgehend fehlte, d.h. die Verbindungen enthielten keine oder höchstens noch eine  $\alpha$ -Aminosäure. Aber selbst dann beträgt die (Effekt)-Bioverfügbarkeit meist nur wenige Prozente. Die Tatsache, dass heute eigentlich kaum mehr eine grosse Nachfrage für *neue* antihypertensive Wirkstoffe besteht (ironischerweise nicht zuletzt wegen dem guten Wirkungsprofil der ACE-Hemmer!) hat in jüngster Zeit dazu geführt, dass die ambitionöse Suche nach oral wirksamen Renin-Hemmer vielerorts, so auch bei uns, reduziert worden ist.

Die erzielten grossen Fortschritte in der Planung und Synthese von 'transition-state'-Renin-Hemmern waren jedoch keineswegs vergebens, selbst wenn einzelne Gruppen das ursprüngliche Ziel, neue antihypertensive Wirkstoffe mit dieser Strategie zu finden, aufgegeben haben. Die erlangten Erkenntnisse können mühelos auf andere Proteasen übertragen werden. Und Renin ist ja bei weitem nicht das einzige proteolytische Enzym, durch dessen Hemmung ein therapeutischer Nutzen erhofft werden kann. Das aktuellste Ziel auf diesem Gebiet ist sicher die HIV-Protease, ein vom AIDS-Virus codiertes Enzym, das für die virale Replikation unentbehrlich ist [37]. Da es wie Renin auch eine *Asparyl*-Protease ist, können die gleichen, in dieser Arbeit beschriebenen 'Rezepte' angewandt werden. Tatsächlich hat es sich gezeigt, dass viele Renin-Hemmer, obwohl nicht für die HIV-Protease optimiert, ausgezeichnete 'Lead'-Verbindungen als HIV-Blocker sind. Zudem kommen für eine antivirale Therapie auch Wirkstoffe in Betracht die zunächst nicht oral wirksam sind.

Dank gebührt meinen Mitarbeitern *K. Christ* und *Ch. Rich*, die die meisten der in dieser Arbeit erwähnten Verbindungen synthetisiert haben. All meinen Kollegen aus der Chemie, Biochemie und Pharmakologie, die am Renin-Projekt beteiligt waren, danke ich für die jahrelange, interessante und konstruktive Zusammenarbeit. Vor allem aber *Dr. E. Pfenniger*, dem 'Pionier' in Sachen Protease-Hemmer in unserer Firma!

Eingegangen am 14. Oktober 1991

- [1] M. A. Ondetti, *Circulation* **1988**, *77*, 1-74.
- [2] a) B. Waerber, J. Nussberger, H. R. Brunner, in 'New Therapeutic Strategies in Hypertension', Eds. N. M. Kaplan, B. M. Brenner und J. H. Larags, Raven Press, New York, 1989, S. 97; b) J. I. S. Robertson, *Drugs* **1990**, *40*, 326.
- [3] A. R. Sielecki, K. Hayakawa, M. Fujinaga, M. E. P. Murphy, M. Fraser, A. K. Muir, C. T. Carilli, J. A. Lewicki, J. D. Baxter, M. N. G. James, *Science* **1989**, *243*, 1346.
- [4] D. H. Rich, in 'Proteinase Inhibitors', Eds. A. J. Barret und G. Salvesen, Elsevier, Amsterdam, 1986, S. 179-208.
- [5] H. Umezawa, T. Aoyagi, H. Morishima, M. Matsuzaki, M. Hamada, T. Takeuchi, *J. Antibiot.* **1970**, *23*, 259.
- [6] J. Boger, N. S. Lohr, E. H. Ulm, M. Poe, E. H. Blaine, G. M. Fanelli, T. Y. Lin, L. S. Payne, T. W. Schorn, B. I. LaMont, T. C. Vassil, I. I. Stabilito, D. F. Veber, D. H. Rich, A. S. Bopari, *Nature (London)* **1983**, *303*, 81.
- [7] a) J. Burton, E. E. Slater, P. Corvol, J. Menard, L. H. Hartley, *Clin. Exp. Hypertens. Theory Pract.* **1982**, *A4*, 322; b) F. X. Galen, C. Devaux, S. Atlas, T. Guyenne, J. Menard, P. Corvol, D. Simon, C. Cazaubon, P. Richer, G. Badouaille, J. P. Richaud, P. Gros, B. Pau, *J. Clin. Invest.* **1984**, *74*, 723; c) V. J. Dzau, R. I. Kopelman, A. C. Barger, E. Haber, *Am. J. Physiol.* **1984**, *246*, H404.
- [8] R. J. Cody, J. Burton, G. Evin, K. Poulson, J. A. Herd, E. Haber, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *97*, 230.
- [9] J. M. Wood, C. Heusser, N. Gulati, P. Forgiarini, K. G. Hofbauer, *Hypertension* **1986**, *8*, 600.
- [10] B. Leckie, M. Szelke, B. Atrash, S. R. Battie, A. Hallett, D. M. Jones, G. D. McIntyre, J. Suerias, D. J. Webb, *Biochem. Soc. Trans.* **1985**, *13*, 1029.
- [11] M. Szelke, D. M. Jones, B. Atrash, A. Hallett, B. J. Leckie, in 'Peptides, Structure and Function', Proceedings of the Eighth American Peptide Symposium, Eds. V. J. Hruby und D. H. Rich, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., 1983, S. 579.
- [12] J. Boger, L. S. Payne, D. S. Perlow, N. S. Lohr, M. Poe, E. H. Blaine, E. H. Ulm, T. W. Schorn, B. I. LaMont, T. Y. Lin, M. Kawai, D. H. Rich, D. F. Veber, *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1779.
- [13] Für neuere Übersichten s.: a) W. J. Greenlee, *Pharmac. Res.* **1987**, *4*, 364; b) W. J. Greenlee, *Med. Res. Rev.* **1990**, *10*, 173; c) T. D. Ocain, M. Abou-Gharbia, *Drugs Future* **1991**, *16*, 37.
- [14] J. R. Luly, J. J. Plattner, H. Stein, N. Yi, J. Soderquist, P. A. Marcotte, H. D. Kleinert, T. J.

- Perun, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, *143*, 44.
- [15] a) B. Weidmann, Patent DE 87-3742474, 1987; b) B. Weidmann, Patent DE 3841319, 1989.
- [16] J. J. Plattner, P. A. Marcotte, H. D. Kleinert, *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 2277.
- [17] a) S. Thaisrivongs, D. T. Pals, D. W. Harris, W. M. Kati, S. R. Turner, *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 2088; b) G. J. Hanson, J. S. Baran, H. S. Lowrie, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *160*, 1.
- [18] A. Vedani, *J. Comput. Chem.* **1986**, *7*, 701.
- [19] A. Widmer, *Interner Bericht, Sandoz AG*, 1987.
- [20] E. Pfenninger hat später eine Synthese des 'richtigen' Hydroxyethylen-Isosteren für Phe-His entwickelt. Persönliche Mitteilung, *Sandoz*, 1990.
- [21] M. Bodanszky, A. Bodanszky, 'The Practice of Peptide Synthesis', Springer-Verlag, Berlin, 1984, S. 145.
- [22] S. Thaisrivongs, D. T. Pals, W. M. Kati, S. R. Turner, L. M. Thomasco, W. Watt, *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 2080.
- [23] J. C. Collins, W. W. Hess, F. J. Frank, *Tetrahedron Lett.* **1968**, 3363.
- [24] K. E. Pfitzner, J. G. Moffat, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 5661.
- [25] D. B. Dess, J. C. Martin, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4155.
- [26] R. Henning, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1990**, *38*, 460.
- [27] A. H. Fray, R. L. Kaye, E. F. Kleinman, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4828.
- [28] E. Pfenninger, B. Weidmann, A. Stoll, Patent GB 86-19182, 1986.
- [29] D. B. Darnon, D. J. Hoover, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6439.
- [30] a) B. Weidmann, Patent DE 3815913, 1988; b) B. Weidmann, Patent WO 8910917 A2, 1989.
- [31] J. M. Wood, N. Gulati, P. Forgiarini, W. Fuhrer, K. G. Hofbauer, *Hypertension* **1985**, *7*, 797.
- [32] D. T. Pals, S. Thaisrivongs, J. A. Lawson, W. M. Kati, S. R. Turner, G. L. DeGraa, D. W. Harris, G. A. Johnson, *Hypertension* **1986**, *8*, 1105; M. DeClaviere, C. Cazaubon, C. Lacour, D. Msato, J. P. Gagnol, G. Evin, P. Corvol, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1985**, *7* (Suppl. 4), 58; M. Tree, B. Atrash, B. Donovan, A. Hallett, M. Hughes, A. F. Lever, J. Morton, J. Sueiras-Dias, *J. Hypertension* **1985**, *3*, 13.
- [33] J. R. Huff, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2305.
- [34] a) F. Cumin, D. Le-Nguyen, B. Castro, J. Menard, P. Corvol, *Biochem. Biophys. Acta* **1987**, *258*, 413; b) F. Cumin, D. Nisato, J.-P. Ganol P. Corvol, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1987**, *10* (Suppl. 7), 102.
- [35] J. P. Evenou, B. Weidmann, E. Pfenninger, R. Metternich, H. Wagner, *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *40*, 765.
- [36] a) A. Hagenbach, R. Metternich, E. Pfenninger, B. Weidmann, Patent DE 87-3701526, 1987; b) A. Hagenbach, R. Metternich, E. Pfenninger, B. Weidmann, Patent DE 3800591 A1; c) M. G. Bock, R. M. DiParrodo, B. E. Evans, R. M. Freidinger, K. E. Rittle, L. S. Payne, J. Boger, W. L. Whitter, B. I. LaMont, E. H. Ulm, E. H. Blaine, T. W. Schorn, D. F. Veber, *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1918; d) G. L. Bundy, D. T. Pals, J. A. Lawson, S. J. Couch, M. F. Lipton, M. A. Mauragis, *ibid.* **1990**, *33*, 2276.
- [37] R. H. Bradbury, J. S. Major, A. A. Oldham, J. E. Rivett, D. A. Roberts, A. M. Slater, D. Timms, D. Waterson, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2335.
- [38] a) M. de Gasparo, F. Cumin, J. Nussberger, T. T. Guyenne, J. M. Wood, J. Menard, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1989**, *27*, 587; b) X. Jeunemaitre, J. Menard, J. Nussberger, T. T. Guyenne, H. R. Brunner, P. Corvol, *Am. J. Hypertens.* **1989**, *2*, 819.

Chimia 45 (1991) 376-378  
© Schweiz. Chemiker-Verband; ISSN 0009-4293

## Bildung 12- bis 40-gliedriger Oligolide aus enantiomerenreinen 3-Hydroxybuttersäure-Derivaten – Bausteine für eine 2<sub>1</sub>- und eine 3<sub>1</sub>-Helix

Hans-Martin Müller, Max Dobler, Peter Zbinden und Dieter Seebach\*

**Abstract.** Trimeric, tetrameric, and pentameric oligolides are formed preferentially from (*S*)- $\beta$ -butyrolactone, or from methyl (*R*)-3-hydroxybutanoate, upon prolonged treatment with catalytic amounts of tetraoxadistannacyclodecane (*Shanzer's* macrolactonization catalyst) in refluxing xylene. The crystal structure of the tetramer is described. Substructures of the larger folded oligolides are used for the construction of a left-handed 2<sub>1</sub>-helix, as found in the biopolymer PHB, and a heretofore unknown right-handed 3<sub>1</sub>-helix.

In zwei früheren Arbeiten [1] haben wir über die Isolierung von Oligoliden aus fünf bis sieben 3-Hydroxybuttersäure-Einheiten aus Makrolaktanisierungsansätzen nach *Yamaguchi* [2] und *Shanzer* [3] berichtet. Wir äusserten den Verdacht, dass Oligolide aus weniger als fünf Einheiten, die wir damals nicht entdeckten, sich eher aufgrund kinetischer als thermodynamischer Effekte nicht bilden.

Wie wir jetzt fanden, werden nach den genannten Methoden mit (*S*)- $\beta$ -Butyrolacton (1/ kat. 2) [4], (*R*)-3-Hydroxybuttersäure und dem zugehörigen Methylester [5]

\*Korrespondenz: Prof. Dr. D. Seebach  
Laboratorium für Organische Chemie,  
Eidgenössischen Technischen Hochschule  
ETH-Zentrum  
Universitätstrasse 16  
CH-8092 Zürich

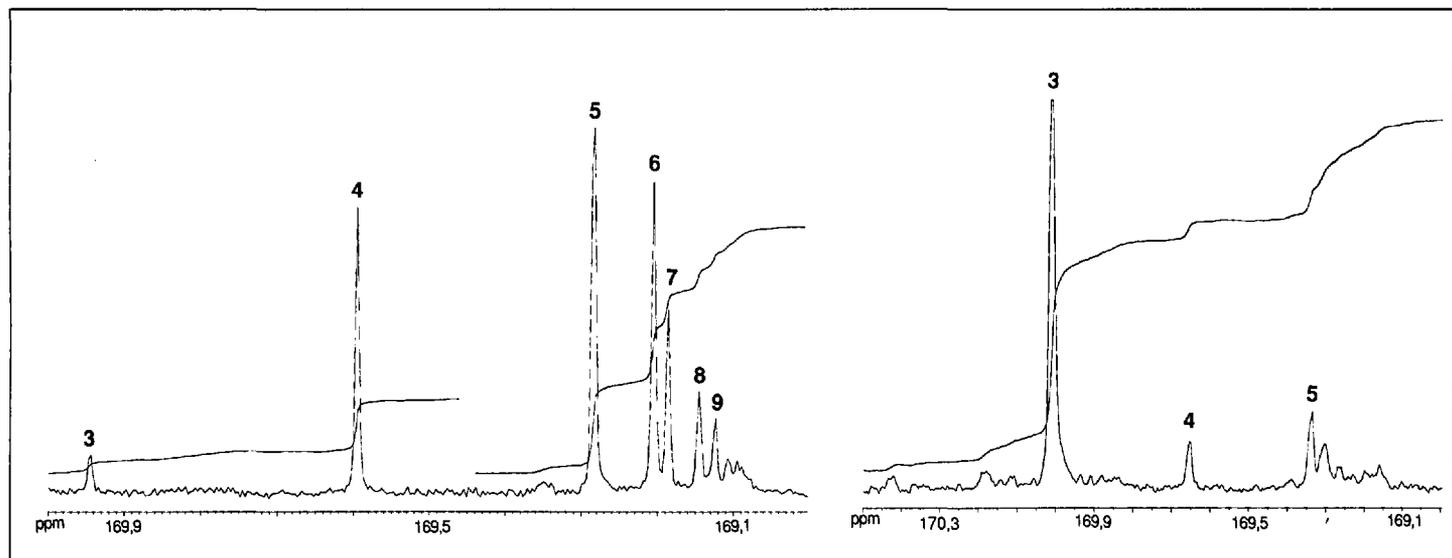


Fig. 1. <sup>13</sup>C-NMR-Spektren (100 MHz) der Carbonyl-Region von Oligolid-Gemischen. Messbedingungen: *invers-gated*-Experiment mit einer Relaxationsverzögerung von 3 s, einer Aquisitionszeit von 3.2 s und einem Pulswinkel von 45°. Links: Rohprodukt des im Schema beschriebenen Ansatzes. Rechts: Rohprodukt einer analogen Reaktion in siedendem Xylol (114 h) statt Benzol.