

Schema 2. In-vitro- und in-vivo-Bildung von Pyridoxylisochinolin-Alkaloiden.

nen von Vitamin B₆ noch erweitert durch die wahrscheinlich nichtenzymatische Pictet-Spengler-Kondensation zu heterocyclischen Metaboliten.

Tabelle 2. Ergebnisse der umgekehrten Isotopenverdünnungsanalyse nach Applikation von Pyridoxin 3* (10 µCi, 20 mg/kg) und L-Dopa 4 (20 mg/kg) an Ratten.

Isoliertes Alkaloid (Probe)	Inkubationszeit [h]	Gesamtradioaktivität [nCi]	Absolute Einbaurate [%] × 10 ²	Alkaloidgehalt [ng/mL bzw. ng/g]
8 (Blut)	4	1.9	1.9	133
8 (Blut)	6	3.0	3.0	206
8 (Leber)	6	0.2	0.2	28
10 (Blut)	2	0.7	0.7	53
10 (Blut)	4	0.8	0.8	57
10 (Leber)	6	<0.007	<0.007	<1

Eingegangen am 2. Oktober,
ergänzte Fassung am 11. November 1985 [Z 1481]

- [1] W. Whaley, T. Govindachari, *Org. React.* 6 (1951) 151.
 [2] P. Holtz, K. Stock, F. Westermann, *Nature (London)* 203 (1964) 656.
 [3] Siehe z. B. M. Sandler, S. Carter, K. Hunter, G. Stern, *Nature (London)* 241 (1973) 439; J. L. Cashaw, K. McMurtrey, H. Brown, V. E. Davis, *J. Chromatogr.* 99 (1974) 567; M. A. Collins, W. Nijm, G. Borge, G. Teas, C. Goldfarb, *Science* 206 (1979) 1184. Übersicht: M. A. Collins in A. Brossi: *The Alkaloids*, Bd. XXI, S. 329, Academic Press, New York 1983.

- [4] H. Bader: *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, Edition Medizin, Verlag Chemie, Weinheim 1983.
 [5] H. Groebe, *Dtsch. Med. Wochenschr.* 98 (1973) 1313.
 [6] C. Schöpf, H. Bayerle, *Justus Liebig's Ann. Chem.* 513 (1934) 190.
 [7] Die Konfiguration des Pyridoxyl-Substituenten an C-1 in **10** und **11** ließ sich ¹H-NMR-spektroskopisch aus der ³J-Kopplung zwischen 1-H_a und 4-H_a als äquatorial, damit *cis* bezüglich der äquatorialen Carboxygruppe und somit als (1R) ermitteln. Zur massenspektrometrischen Analyse wurden **8** und **10** enzymatisch zu **9** und **11** dephosphoryliert (saure Phosphatase, H₂O, pH 5), da sie als Phosphorsäureester auch nicht durch schonende Ionisationstechniken (Feldesorption oder Fast Atom Bombardment) erfassbar waren. – Über die Darstellung dieser Kondensationsprodukte wurde bereits berichtet, ihre spektroskopische Charakterisierung war jedoch unvollständig, wobei vor allem die Konfiguration möglicher epimerer Produkte vernachlässigt wurde: E. A. Rudd, W. C. Cunningham, J. W. Thanassi, *J. Med. Chem.* 22 (1979) 233; C. Borri Voltattori, A. Orlacchio, A. Giartosio, F. Conti, C. Turano, *Eur. J. Biochem.* 53 (1975) 151; T. Kametani, M. Koizumi, K. Okui, Y. Nishii, M. Ono, *J. Med. Chem.* 15 (1972) 203; J. H. Fellman, E. S. Roth, *Biochemistry* 10 (1971) 408; H. F. Schott, W. G. Clark, *J. Biol. Chem.* 196 (1952) 449.
 [8] Bei der Bewertung der absoluten Einbauraten (Gesamtradioaktivität der isolierten Alkaloide dividiert durch die der markierten Vorstufe 3 × 100) ist zu berücksichtigen, daß die dem Körper vertrauten Vorstufen nach ihrer Verteilung im lebenden Organismus auch in konkurrierende Stoffwechselwege einfließen und daß darüber hinaus auch die Alkaloide ihrerseits rasch weiter umgewandelt zu werden scheinen.

Der Ferrocenylmethyl(Fem)-Rest als hochlipophile und chromophore Gruppe zur Maskierung von Peptidbindungen**

Von Heiner Eckert* und Christoph Seidel

Für eine neue Strategie zur Chemosynthese von Peptiden^[1], die durch Verwendung stark lipophiler und chromophorer Gruppen gekennzeichnet ist, wurde eine Methode zur Maskierung von Peptidbindungen entwickelt. Die Behandlung der chemisch reaktiven funktionellen Gruppen ist durch die konventionellen Schutzgruppentechniken^[2] weitgehend abgedeckt. Peptidbindungen sind hingegen vor allem „physikalisch reaktiv“, das heißt, sie haben großen Einfluß auf Sekundärstruktur und Löslichkeit eines Peptids. Solche Konformationseffekte erschweren oft die Synthese. Versuche, diese Effekte zu verhindern^[3], wurden von Weygand et al. mit dem 2,4-Dimethoxybenzyl-Rest^[3a] unternommen. Ugi et al. erkannten die präparative Nützlichkeit der lipophilen und chromophoren Ferrocenylalkyl-Gruppierung in stereospezifischen Reagentien^[3b]. Von Ragnarsson et al. wurde kürzlich die *tert*-Butoxycarbonylierung der Peptidbindung in einem Prolyl-glycin-Derivat^[3c] beschrieben.

Der chromophore (gelbe) Ferrocenylmethyl(Fem)-Rest^[4] ermöglicht eine wirtschaftlich günstige, regenerative Maskierung von Peptidbindungen zur Unterdrückung oder Manipulation von Sekundärstrukturen und zur lipophilen Solubilisierung von Peptid-Derivaten. Der Fem-Rest kann durch einfache katalytische reduktive Alkylierung von Aminosäuren oder Aminosäure-estern mit kommerziell erhältlichem Ferrocencarbaldehyd **1** und Wasserstoff eingeführt werden. Als Hydrierkatalysator kommt das hochselektive Palladium(II)-phthalocyanin^[5] in Betracht: Während **1** nur äußerst langsam reduziert wird, läßt sich das aus **1** und der Aminosäure bzw. dem Aminosäureester erhaltene Azomethin **2** innerhalb einiger Stunden hydrieren. Dabei entstehen die Fem-Aminosäuren bzw. deren Ester racemisierungsfrei und in hohen Ausbeuten (Tabelle 1),

*] Dr. H. Eckert, C. Seidel

Organisch-chemisches Institut der Technischen Universität München
Lichtenbergstraße 4, D-8046 Garching

**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

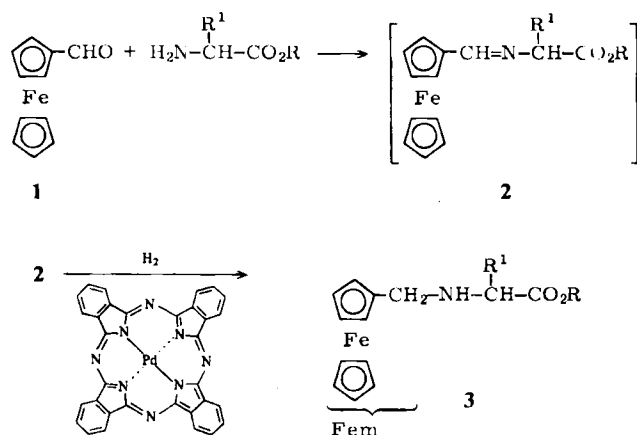


Tabelle 1. Synthese von Fem-Aminosäuren und Derivaten (3, R=H b.w. Me, *t*Bu, Na).

	Fem-NH-CHR ¹ -CO ₂ R 3	Ausb. [%]	Fp [°C]	[α] _D ²⁵ (λ [nm])
3a	Fem-Gly-OH	73	198	—
3b	Fem-Gly-OMe	60	Öl	—
3c	Fem-Ala-ONa	83	232	-38.3 (546)
3d	Fem-Ala-OMe	71	Öl	-73.3 (546); -53.4 (589)
3e	Fem-Phe-ONa	82	305	-9.5 (546)
3f	Fem-Phe-OrBu	81	Öl	-13.8 (589)
3g	Fem-Leu-OrBu	85	Öl	-26.7 (546)
3h	Fem-Val-OrBu	89	Öl	-34.0 (546); -23.5 (589)

ohne weiter reduziert zu werden. Der racemisierungsfreie Ablauf der Reaktion wird am Beispiel der ziemlich racemisierungsanfälligen Aminosäure Phenylalanin gezeigt: Nach dem Isolieren und anschließenden Hydrieren von Ferrocenylmethylphenylalanin wird der Ester Fem-Phe-OrBu mit Trifluoressigsäure total deblockiert und die spezifische Drehung des freien Phenylalanins zu $[\alpha]_D^{25} -32.7$ bestimmt. Dieser Wert ist identisch mit dem des ursprünglichen Phenylalanins. Fem-Aminosäuremethylester sind recht stabil; so kann Fem-Gly-OMe ohne Zersetzung quantitativ destilliert werden ($K_p=235^\circ\text{C}/0.1$ Torr). Dagegen zersetzt sich der entsprechende „freie“ Ester H-Gly-OMe bereits bei Raumtemperatur innerhalb weniger Stunden quantitativ zu 2,5-Diketopiperazin.

Die Kupplungsreaktionen von *N*-geschützten Aminosäuren mit Fem-Aminosäure-Derivaten 3 zu Peptiden 4 mit Fem-maskierten Peptidbindungen können vorteilhaft nach der DCCI-Methode^[2a,6] innerhalb weniger Stunden durchgeführt werden (Tabelle 2). Die Ausbeuten sind allgemein hoch, und sogar die sterisch extrem stark gehinderte Verknüpfung von Tcboc-Val-OH^[6] mit Fem-Val-OrBu 3h liefert noch 50% Ausbeute an 4f. Die Untersuchung der Racemisierung^[2a] während der Verknüpfung von Boc-Gly-Fem-Ala-OH mit H-Leu-OrBu durch DCCI ergibt das Izumiya-Testpeptid-Derivat Boc-Gly-Fem-Ala-Leu-OrBu (92% Ausbeute) mit 27% D-Alanin und 73% L-Alanin. Die Vergleichsreaktion ohne Fem-Rest unter denselben Bedingungen (84% Ausbeute) liefert das Testpeptid-Derivat mit 12% D-Alanin und 88% L-Alanin. Dieser Sachverhalt ist bei racemisierungsanfälligen Fragmentkondensationen zu beachten. Dagegen erhält man bei der Kupplung von Tcboc-Fem-Ala-OH mit H-Leu-OrBu (85% Ausbeute) nur <0.02% D-Alanin. Dies bedeutet, daß bei der Verknüpfung mit *N*-urethangeschützten Fem-Aminosäuren keine Racemisierung stattfindet und somit unter diesem Gesichtspunkt eine stufenweise Peptidsynthese unproblematisch ist.

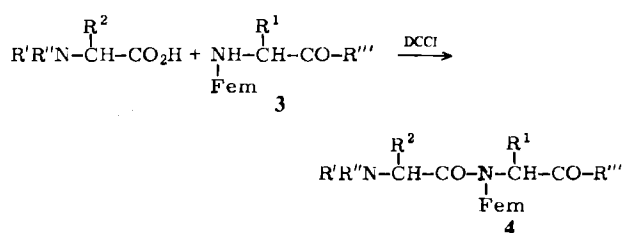


Tabelle 2. Kupplungsreaktionen mit Fem-Aminosäure-Derivaten 3 zu Peptiden 4 mit Fem-geschützter Peptidbindung [6].

Edukte	Produkte	Ausb. [%]
Z-Ala-OH + Fem-Phe-OrBu 3f	Z-Ala-Phe-OrBu Fem 4a	83
Boc-Gly-OH + Fem-Ala-OMe 3d	Boc-Gly-Ala-OMe Fem 4b	91
Boc-Gly-OH + Fem-Ala-Leu-OrBu	Boc-Gly-Ala-Leu-OrBu Fem 4c	75
Tcboc-Phe-OH + Fem-Leu-OrBu 3g	Tcboc-Phe-Leu-OrBu Fem 4d	93
Tcboc-Fem-Gly-OH + Fem-Gly-OMe 3b	Tcboc-Fem-Gly-Gly-OMe Fem 4e	80
Tcboc-Val-OH + Fem-Val-OrBu 3h	Tcboc-Val-Val-OrBu Fem 4f	50

Zwischenprodukte, welche den Fem-Rest enthalten, können leicht durch Säulenchromatographie an preisgünstigen Kieselgelen in Lösungsmitteln auf der Basis von Hexan (hohe Trennleistung) gereinigt werden. Dies ist wegen ihrer außerordentlich hohen Lipophilie^[7] und starken gelben Eigenfarbe möglich. Die Fem-Gruppe läßt sich mit Trifluoressigsäure/ β -Thionaphthol in Dichlormethan innerhalb 2–4 h mit gleicher Geschwindigkeit wie die Boc- oder OrBu-Reste abspalten.

Arbeitsvorschriften

Fem-Aminosäuren (als Natriumsalze 3, R=Na): Eine Suspension aus 10 mmol Aminosäure, 2.14 g (10 mmol) 1, 2.12 g (20 mmol) wasserfreiem Na₂CO₃ und 0.06 g (0.1 mmol) Palladium(II)-phthalocyanin [5] in 40 mL Methanol wird mit H₂ gesättigt und unter H₂ (aus einer Gasburette) einige Stunden heftig gerührt, bis die Gasaufnahme beendet ist. Man filtriert die Suspension über eine 4 cm dicke Na₂SO₄-Schicht, wäscht mit Methanol nach und engt das Filtrat auf 10–20 mL ein. Durch Zugabe von Ether fällt das Natrium Salz der Fem-Aminosäure aus. Dieses wird aus Wasser oder Methanol/Wasser umkristallisiert. Man erhält gelbe Kristalle.

Fem-Aminosäureester 3, R=Alkyl: Ein Gemisch aus 10 mmol Aminosäureester (-hydrochlorid), 2.14 g (10 mmol) 1 und 0.06 g (0.1 mmol) Palladium(II)-phthalocyanin [5] in 10 mL Methanol und 20 mL Essigester (bei Aminosäureester-hydrochloriden zusätzlich 0.8 mL (11 mmol) Triethylamin) wird mit H₂ gesättigt und unter H₂ (aus einer Gasburette) einige Stunden heftig gerührt, bis die Gasaufnahme beendet ist. Man filtriert über eine 4 cm dicke Na₂SO₄-Schicht, wäscht mit Essigester nach und engt das Filtrat ein. Der Rückstand wird in Hexan/Essigester (ca. 3:1) an Kieselgel chromatographiert. Man erhält ein tief orangefarbenes Öl.

Kupplungsreaktionen zu 4: 10 mmol *N*-urethangeschützte Aminosäure und 10 mmol Fem-Aminosäureester 3, R=Alkyl, werden in 40 mL Dichlormethan auf -20°C gekühlt. Dazu tropft man eine Lösung von 2.27 g (11 mmol) DCCI in 10 mL Dichlormethan innerhalb 5 min und nimmt anschließend das Kühlbad fort. Nach 12 h wird vom Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und das Filtrat eingengt. Der Rückstand wird in Hexan/Essigester (ca. 3:1) an Kieselgel chromatographiert^[7]. Man erhält einen gelben Hartschaum.

Eingegangen am 13. August,
ergänzte Fassung am 15. November 1985 [Z 1427]

- [1] a) H. Eckert, Y. Kiesel, C. Seidel, C. Kaulberg, H. Brinkmann, 5th USSR-FRG Symposium on Chemistry of Peptides and Proteins, Odessa (UdSSR), 16.–21. Mai 1985; b) H. Eckert, C. Seidel, 1st German-Japanese Symposium on Peptide Chemistry (Akabori Conference), Grainau, 12.–13. Juni 1985.
- [2] a) E. Wünsch in Houben-Weyl: *Methoden der Organischen Chemie*, 4. Aufl., Bd. 15, Thieme, Stuttgart 1974; b) A. Hubbuch, *Kontakte* 1979, Nr. 3, S. 14; c) E. E. Büllesbach, *ibid.* 1980, Nr. 1, S. 23.
- [3] a) F. Weygand, W. Steglich, J. Bjarnason, R. Akhtar, N. Chytil, *Chem. Ber.* 101 (1968) 3623; b) D. Marquadrting, P. Hoffmann, H. Heitzer, I. Ugi, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 1969; c) L. Grehn, U. Ragnarsson, *Angew. Chem.* 97 (1985) 519; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 510.
- [4] Wir schlagen Fem als Abkürzung für Ferrocenylmethyl vor.
- [5] H. Eckert, G. Fabry, Y. Kiesel, G. Raudaschl, C. Seidel, *Angew. Chem.* 95 (1983) 894; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22 (1983) 881; *Angew. Chem. Suppl.* 1983, 1291.
- [6] Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, DCC1 = Dicyclohexylcarbodiimid, Tcboc = 2,2,2-Trichlor-*tert*-butoxycarbonyl [2b], Z = Benzyloxycarbonyl.
- [7] Die Peptid-Derivate 4 aus Tabelle 2 haben in Hexan/Essigester (3:1) R_F -Werte von 0.35 bis 0.7 (auf DC-Platte Kieselgel 60).

Synthese des all-L-konfigurierten Cyclotetradepsipeptids *cyclo*[-L-Val-L-Lac-]₂ nach dem kombinierten Schutz-/Aktivierungsverfahren mit der 2,4-Bis(methylthio)phenoxy-carbonyl-Gruppe**

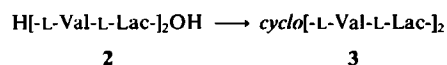
Von Horst Kunz* und Hans-Jürgen Lasowski
Professor Rolf C. Schulz zum 65. Geburtstag gewidmet

Die natürlichen cyclischen Depsipeptide zeichnen sich durch selektives Komplexierungsvermögen und antibiotische Eigenschaften aus^[1]. Da ihre Biosynthese^[2] von der der Peptide abweicht, sind sie durch gentechnologische Verfahren nicht zugänglich. Der schwierigste Schritt der chemischen Depsipeptidsynthese ist die Cyclisierung. Besonders beim Ringschluß zu den kleineren Cyclodepsipeptiden hängt der Erfolg stark von der Konfiguration der Bausteine ab, wie Shemyakin et al.^[3] an mehreren Tetradepsipeptiden 1 aus *N*-Methylvalin und α -Hydroxyisovaleriansäure gezeigt haben. Die Ausbeuten lagen bei 40–75%, sofern mindestens einer der vier Bausteine eine an-

H-MeVal-Hyiv-MeVal-Hyiv-OH 1

dere Konfiguration als die übrigen hat. Das all-D-konfigurierte Diastereomer von 1 ließ sich dagegen nur in 8% Ausbeute cyclisieren. Noch geringer ist die Neigung zur Cyclisierung trotz entgegengesetzter Konfiguration der Bausteine, wenn die Aminosäure-Bausteine in 1 keine *N*-Methylgruppen enthalten. Das entsprechende Cyclotetradepsipeptid entstand nur in 6% Ausbeute^[3]. In der Natur werden aber dennoch Cyclotetradepsipeptide ohne *N*-Methylgruppen gebildet, z. B. *cyclo*[-L-Hyiv-L-Ile-Hyiv-D-allo-Ile-], und das sogar über all-L-konfigurierte Vorstufen^[4].

Bei Arbeiten an neuen Methoden der Depsipeptidsynthese^[5] haben wir jetzt ein Konzept für die chemische Cyclisierung auch solcher Tetradepsipeptide wie 2 entwickelt, die nur gleichkonfigurierte Bausteine und keine *N*-Methylgruppen enthalten.



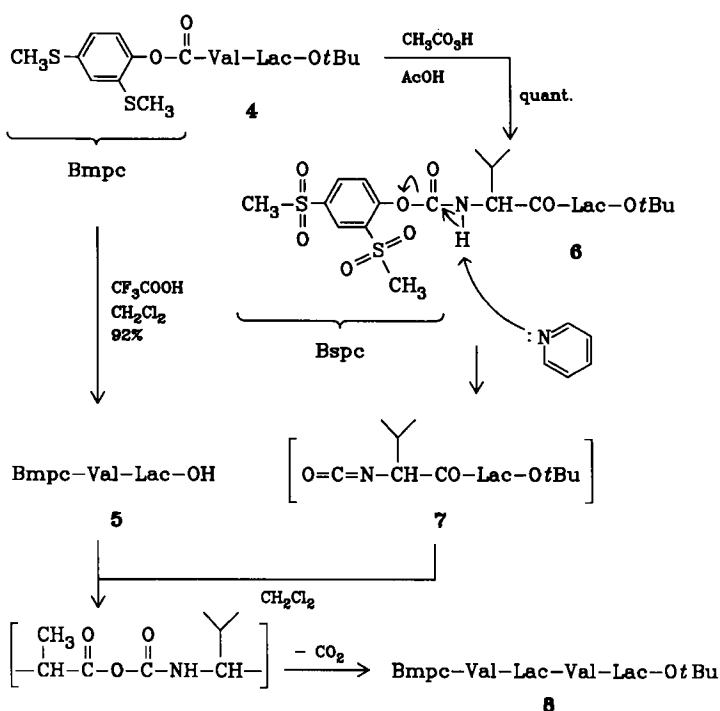
[*] Prof. Dr. H. Kunz, Dr. H.-J. Lasowski
Institut für Organische Chemie der Universität
Johann-Joachim-Becher-Weg 18-20, D-6500 Mainz

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

Diesen Ringschluß, bei dem beide oben genannten, erschwerenden Faktoren zusammentreffen, erreichen wir mit der aktivierbaren 2,4-Bis(methylthio)phenoxy-carbonyl(Bmpc)-Aminoschutzgruppe. Sie wird über den Chlorameisensäure-2,4-bis(methylthio)phenylester in die Aminosäuren eingeführt, wie dies für die 4-Methylthiophenoxy-carbonyl(Mtpc)-Gruppe schon beschrieben worden ist^[6]. Auch die Verknüpfung der Bmpc-Aminosäuren mit L-Milchsäure geschieht analog dem dort angegebenen Verfahren^[6] mit Benzolsulfonylchlorid^[7].

Die Bmpc-Gruppe des geschützten Didepsipeptids 4 ist stabil gegen Trifluoressigsäure in Dichlormethan, so daß der *tert*-Butylester selektiv unter Bildung von 5 gespalten werden kann. Mit wasserfreier Peressigsäure in Eisessig^[8] (10%) kann die Bmpc-Gruppe in 4 zur 2,4-Bis(methylsulfonyl)phenoxy-carbonyl(Bspc)-Gruppe in 6 aktiviert werden (Schema 1).

Bereits mit Pyridin wird aus der Bspc-Gruppe 2,4-Bis(methylsulfonyl)phenol eliminiert; 6 geht dabei in das Isocyanat 7 über. Wird 7 in Gegenwart der zu verknüpfenden Carboxykomponente 5 freigesetzt, so reagiert diese direkt mit 7 über das gemischte Carbonsäure-carbaminsäure-anhydrid zum gewünschten geschützten Tetradepsipeptid 8.



Schema 1. Reaktionsbedingungen: 20 mmol 5 und 20 mmol 6 in 160 mL wasserfreiem CH₂Cl₂/32 mL wasserfreiem Pyridin, Molekularsieb 4 Å, Raumtemperatur, präparative HPLC in Petrolether/Essigester (4:1). 8 entsteht in 57% Ausbeute (bezogen auf 5).

Die von uns früher verwendete Mtpc-Gruppe^[6] zeigte hier den Nachteil, daß zur Eliminierung aus der Sulfonyl(Mspc)-Form Triethylamin benötigt wird, das teilweise auch die nicht-aktivierte Mtpc-Gruppe angreift. Die so gewonnenen Depsipeptide enthielten nicht abtrennbare niedrigere Homologe (nachweisbar nur durch analytische HPLC). Mit dieser Gruppe gelang daher keine Cyclisierung.

Zur Cyclisierung wird 8 mit Trifluoressigsäure C-terminal zu 9 deblockiert und dieses dann mit wasserfreier Peressigsäure an der *N*-terminalen Schutzgruppe zu 10 aktiviert (Schema 2). In verdünnter Dichlormethanolösung wird