

106. Rationelle Synthese von α -L-Homoprolin¹⁾ und einiger Derivate. Herstellung von 7- α -L-Homoprolin-bradykinin

von L. Balásperi, B. Penke, Gy. Papp, Gy. Dombi und K. Kovács

Institut für Organische Chemie der Attila József Universität Szeged (Ungarn)

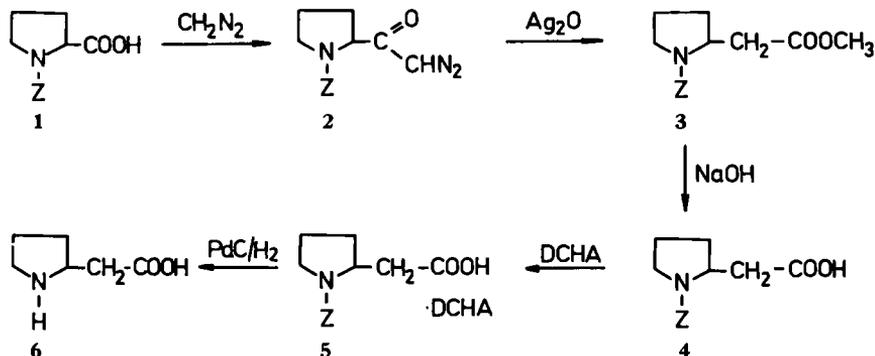
(17. I. 75)

Summary. Optically pure α -L-homoproline can be prepared with good yield from N-benzyloxycarbonyl-L-proline through its diazoketone-derivative. Preparation of derivatives of α -L-homoproline used in peptide chemistry, and of 7- α -L-homoproline-bradykinin, as well as biological investigation of the latter are described.

Die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der chemischen Struktur und der biologischen Aktivität bekannter Peptidhormone liefert wertvolle Informationen über die Synthese von Analogen, in denen statt der ursprünglichen Aminosäure strukturell ähnliche, «nicht-proteinbildende» Aminosäuren [1] verwendet werden. Statt Prolin wurde von anderen Forschern [2–6] und auch von unserer Gruppe [7–13] meistens Pipekolinsäure verwendet. In Laufe unserer Arbeit zeigte sich, dass auch α -L-Homoprolin anwendbar ist, das unseres Wissens früher für peptidsynthetische Arbeiten nicht verwendet wurde. Im folgenden berichten wir über die peptidchemische Anwendung des α -L-Homoprolins²⁾.

Vor allem wurde eine rationelle Synthese des L-Homoprolins ausgearbeitet (Schema 1). Es gelang uns, aus Z-L-Prolin **1** auf dem in dieser Zeitschrift beschriebenen Wege [14] α -L-Homoprolin **6** in optisch reiner Form mit guter Ausbeute zu erhalten.

Schema 1



1) Die Benzyloxycarbonyl-Gruppe ist abgekürzt mit Z, die Methylester-Gruppe mit OMe, das Dicyclohexylcarbodiimid mit DCCI, das 1-Hydroxybenzotriazol mit HOBT, das Dicyclohexylamin mit DCHA, das N-Hydroxysuccinimid mit HOSu, α -L-Homoprolin (Pyrrolidin-2-essigsäure) mit HoPro bezeichnet.

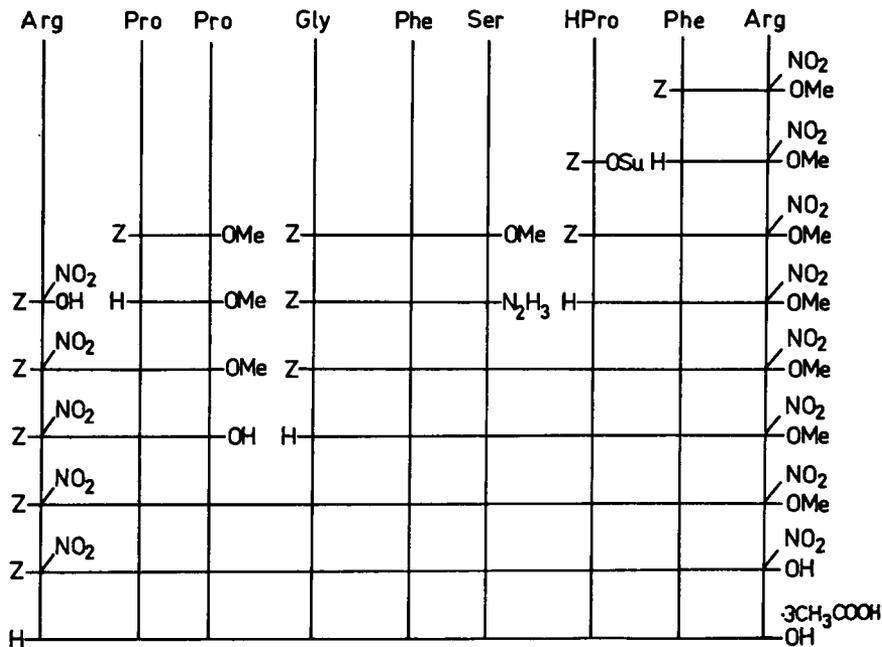
2) Diesbezügliche Einzelheiten sind bisher unpubliziert.

Aus **1** und Diazomethan wurde über das gemischte Anhydrid das Diazoketon **2** und daraus durch *Wolf*'sche Umlagerung in Gegenwart von Ag_2O -Katalysator *Z*- α -L-Homoprolin-OMe **3** erhalten, das durch Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt wurde. (Die photokatalytische Umlagerung von **2** zu **3** zeigte sich nicht gangbar.) Alkalische Hydrolyse des **3** führte zu *Z*- α -L-homoprolin **4**, das als DCHA-Salz **5** in Kristallform isoliert wurde. Das optisch reine α -L-Homoprolin **6** wurde durch hydrogenolytische Abspaltung der *Z*-Gruppe erhalten. Reinheitskontrolle und Identifizierung der Zwischen- und Endprodukte wurde durch Dünnschichtchromatographie, IR.- und NMR.-Spektroskopie, Elementaranalyse und Messung der optischen Drehung durchgeführt.

Aus **4** wurde mit HOSu der *Z*- α -L-Homoprolinsuccinimidester **7** und mit Ammoniak über das gemischte Anhydrid das *Z*- α -L-Homoprolinamid **8** erhalten.

Zur Synthese des 7- α -L-Homoprolin-bradykinins wurde die Methode der Fragmentkondensation benützt; das bekannte Nonapeptid-Analog wurde durch Kuppelung von drei Tripeptid-Fragmenten hergestellt (*Schema 2*).

Schema 2



Der aktivierte Ester **7** wurde mit dem Dipeptid **10** gekuppelt. Vom Tripeptid **11** wurde die *Z*-Gruppe durch 4*N* HBr in Eisessig entfernt. Der freie Tripeptidester **12** wurde mit dem aus dem Tripeptidhydrazid **13** hergestellten Azid, ohne Isolierung des letzteren, mit dem geschützten Hexapeptidester **14** gekuppelt. Nach Abspaltung der *Z*-Gruppe von **14** wurde der freie Hexapeptidester mit dem Tripeptid **15** durch DCCI-Kondensation in Gegenwart von HOBT gekuppelt. Die Methylester-Gruppe

wurde vom Nonapeptidester **16** durch alkalische Hydrolyse und die anderen Schutzgruppen vom Nonapeptid **17** durch katalytische Hydrierung entfernt. Das freie Nonapeptid **18** wurde durch Chromatographie an CM-Cellulose gereinigt. Die Reinheit des Endproduktes wurde durch Aminosäuren-Analyse, Elementaranalyse, Elektrophorese, Dünnschichtchromatographie und Messung der optischen Drehung kontrolliert.

Das Produkt zeigte an Ratten-Ileum getestet dieselbe Aktivität wie synthetisches Bradykinin³⁾.

Die Verfasser danken Frau Dr. K. Lang, Leiterin unseres mikroanalytischen Laboratoriums und ihren Mitarbeitern für die Elementaranalysen und IR.-Spektren, Herrn R. Ferenczi und J. Fülöp für die Aminosäuren-Analysen und technische Hilfe, Herrn Dr. J. Lonovics⁴⁾ für die biologischen Untersuchungen.

Experimenteller Teil

Allgemeine Bemerkungen. Die Smp. wurden auf einem Kofler-Block und die Drehungen mit einem Zeiss-Polarimeter bestimmt und sind korrigiert. IR.-Spektren wurden mit einem Spektrophotometer Unicam SP 200 in KBr-Pastillen ermittelt; NMR.-Spektren wurden bei 60 MHz mit einem NMR.-Spektrophotometer JEOL in Deuteriochloroform bestimmt. Reinheitskontrollen und Identifizierung geschahen dünn-schichtchromatographisch an Kieselgelplatten (Merck). Die Laufmittel hatten folgende Zusammensetzung: A) 1-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1; B) Essigester/Pyridin/Eisessig/Wasser 120:20:6:11; C) Essigester/Pyridin/Eisessig/Wasser 60:20:6:11; D) Essigester/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:11; E) Chloroform/Methanol 8:2; F) Chloroform/Methanol 9:1; G) Chloroform/Aceton 7:3; H) Chloroform/Aceton 9:1; I) Chloroform/Tetrachlorkohlenstoff/Methanol 5:4:1; J) Eisessig/Benzol 7:1. Anfärbung mit Ninhydrin, Chloroluidin-Reagens, Sakaguchi-Reagens.

Diazoketon 2. 24,93 g (100 mmol) Z-L-Prolin werden in 200 ml Äther gelöst, auf -15° gekühlt und unter Rühren tropfenweise mit 14 ml (100 mmol) Triäthylamin und 13 ml (100 mmol) Chlorameisensäure-sec.-butylester versetzt. Das ausgefällte Triäthylaminhydrochlorid wird abfiltriert und bei derselben Temperatur 420 ml (150 mmol) Diazomethan in ätherischer Lösung tropfenweise zum Reaktionsgemisch gegeben, 4 Std. unter 0° gerührt und über Nacht im Kühlschrank stehengelassen; die ätherische Lösung mit Wasser, verdünnter Natriumhydrogencarbonatlösung und wieder mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zuletzt i. V. zur Trockene eingedampft: 25,09 g Öl (91%), chromatographisch rein; Rf (A) 0,7; Rf (C) 0,95; Rf (E) 0,9; Rf (I) 0,8.

Z- α -L-Homoprolinmethylester (3). 12,02 g (44 mmol) **2** werden in 110 ml Methanol gelöst und mit 1,78 g (8,8 mmol) Ag₂O am Wasserbad unter Rückfluss 12 Std. gekocht. Der Katalysator wird abfiltriert, das Filtrat eingedampft und der Rückstand (Öl) an 300 g Kieselgel chromatographisch unter Lichtausschluss gereinigt. Zum Eluieren wird Chloroform/Methanol mit steigender Methanol-Konzentration benützt. Nach Entfernung der Verunreinigungen wird bei 10% Methanol-Konzentration das Produkt eluiert: 11,5 g Öl (95,1%), chromatographisch rein; Rf (A) 0,7; Rf (C) 0,95; Rf (E) 0,9; Rf (I) 0,8.

Z- α -L-Homoprolin (4). 11,5 g (41,8 mmol) **3** werden in 20 ml Methanol gelöst und mit 22 ml (90 mmol) 4 N Natriumhydroxidlösung versetzt. Die zuerst entstandene Emulsion geht allmählich in Lösung. Nach 2 Std. Rühren bei RT. wird das Reaktionsgemisch mit konz. Salzsäure angesäuert und mit Essigester extrahiert. Die Essigesterphase wird mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. V. zur Trockene eingedampft: 9 g (81,5%) chromatographisch reines Öl, Rf (A) 0,6; Rf (C) 0,75; Rf (E) 0,85; Rf (I) 0,65. - IR.: $\nu_{\max}(\text{C}=\text{O})$: 1695, 1635 cm⁻¹; $\nu_{\max}(\text{C}-\text{H})$: 2890-2990 cm⁻¹, $\nu_{\max}(\text{Ar})$: 1410 cm⁻¹, 710 cm⁻¹. - NMR.: δ_{A} = 3,45 ppm, δ_{H} = 2,05 ppm, δ_{C} = 1,95 ppm, δ_{D} = 4,3 ppm, δ_{E} = 1,2 ppm.

³⁾ Als Standard wurde das Präparat «BRS 640» Sandoz benützt.

⁴⁾ Klinik für Interne Medizin N° 1. der Medizinischen Universität Szeged.

Dicyclohexylammoniumsalz des Z- α -L-Homoprolins (5). 10,5 g (40 mmol) **4** werden in 50 ml Essigester gelöst, auf 60° erwärmt; 9,8 ml (50 mmol) DCHA werden tropfenweise zur Lösung gegeben und das Gemisch langsam auf RT. abkühlen gelassen. Die ausgeschiedenen Kristalle werden abfiltriert, mit kaltem Essigester gewaschen und aus Äthanol umkristallisiert: 16,06 g (90,1%), Smp. 145–146°, $[\alpha]_{25}^D = -6^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

$C_{96}H_{41}N_8O_4$ (445,59) Ber. C 70,09 H 9,2 N 6,28% Gef. C 69,81 H 9,1 N 6,20%

α -L-Homoprolin (6). 4,36 g (10 mmol) **5** werden in 15 ml Äthanol gelöst, 5N Schwefelsäure in Überschuss zugegeben und $\frac{1}{2}$ Std. bei RT. gerührt. Die Lösung wird i. V. zur Trockene eingedampft. Der Rückstand (2,67 g chromatographisch reines Öl) wird in 25 ml Methanol gelöst und in Gegenwart von Pd/C katalytisch hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wird die Lösung i. V. eingedampft. Die ausgefallenen Kristalle werden abfiltriert, mit Äther gewaschen und aus Äthanol/Äther umkristallisiert. 1,0 g (77,5%), Smp. 194–196°, $[\alpha]_{25}^D = -72^\circ$ ($c = 1$, 3N Salzsäure). IR.: $\nu_{\max}(C=O)$ 1695, 1635 cm^{-1} , $\nu_{\max}(C-H)$ 2890–2990. – NMR.: δ_H : 1,2 ppm.

$C_6H_{11}NO_3$ (129,15) Ber. C 55,79 H 8,59 N 10,8% Gef. C 55,65 H 8,50 N 10,8%

Z- α -L-N-(Homopropyl-oxo)-succinimid (7). 9,0 g (35 mmol) **4** und 4,6 g HOSu werden in 75 ml Dioxan/1,2-Dimethoxyäthan 1:1 gelöst, gekühlt und 7,3 g (35 mmol) DCCI zugegeben. Das Gemisch wird 2 Std. kalt, dann 2 Std. bei RT. gerührt und über Nacht stehengelassen. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert und mit Dioxan gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden i. V. eingedampft, das zurückbleibende Öl in Essigester aufgenommen, die Lösung mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zuletzt i. V. wieder zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird aus 2-Propanol umkristallisiert: Smp. 92–94°, $[\alpha]_{25}^D = -20^\circ$ ($c = 1$, Methanol). Ausbeute 5,4 g (66,7%).

$C_{18}H_{20}N_2O_6$ (360,37) Ber. C 59,9 H 5,59 N 7,8% Gef. C 59,2 H 5,3 N 7,9%

Z- α -L-Homoprolinamid (8). 10,52 g (40 mmol) **4** werden in 70 ml Essigester gelöst und unter Rühren auf -20° gekühlt; dann werden 4,44 ml (40 mmol) N-Methylmorpholin und 5,2 ml (40 mmol) Chlorameisensäure-sec.-butylester unter Rühren tropfenweise zugegeben. Das nach 2 Min. ausgefallene N-Methylmorpholin-Salz wird abfiltriert, das gesamte gemischte Anhydrid in ein vorher auf -20° gekühltes Reaktionsgefäß gestellt und bei derselben Temperatur 1 Std. lang Ammoniak-Gas durchgeleitet. Nach 2 Std. Rühren (1 Std. bei 0° und 1 Std. bei RT.) und wiederholtem Filtrieren wird die Mutterlauge mit verd. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel i. V. eingedampft und der ölige Rückstand aus Essigester/Äther kristallisiert. Ausbeute 7,97 g (76,0%), Smp. 129–130°, $[\alpha]_{25}^D = -27^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

$C_{14}H_{18}N_2O_3$ (262,32) Ber. C 64,13 H 6,9 N 10,68% Gef. C 64,10 H 7,15 N 10,34%

Z- α -L-Homopropyl-L-phenylalanyl-L-nitroargininmethylester (11). 5,14 g (10 mmol) **9** werden mit 4N HBr in Eisessig bei RT. 45 Min. lang behandelt, das gebildete Dipeptidester-hydrobromid **10** mit Äther gefällt, abfiltriert, mit Äther gewaschen und i. V. getrocknet. **10** wird in Dimethylformamid gelöst, die Lösung auf 0° gekühlt, mit 11,1 ml (10 mmol) N-Methylmorpholin, und hierauf mit 3,6 g (10 mmol) **7** versetzt, 1 Std. bei 0° gerührt und nach 24 Std. Stehen bei RT. auf Wasser gegossen. Die Suspension wird mit Essigester extrahiert und der Extrakt mit verd. Natriumhydrogencarbonatlösung, 1N Ammoniumhydroxidlösung, verd. Salzsäure und Wasser gewaschen. Das zurückgebliebene Öl wird mit Äther verrieben und aus 2-Propanol/Äther kristallisiert. 4,85 g (79%) weisse Kristalle, Smp. 86–89°, $[\alpha]_{25}^D = -30^\circ$ ($c = 1$, Dimethylformamid).

$C_{20}H_{30}N_7O_8$ (625,6) Ber. C 57,6 H 6,3 N 15,7% Gef. C 57,1 H 6,0 N 15,4%

Z-Glycyl-L-phenylalanyl-L-seryl- α -L-homopropyl-L-phenylalanyl-L-nitroargininmethylester (14). 1,87 g **11** werden mit 4N HBr in Eisessig bei RT. 45 Min. behandelt, das gebildete Tripeptidester-hydrobromid **12** mit Äther gefällt, abfiltriert, mit Äther gewaschen und i. V. getrocknet. **12** wird in 10 ml Dimethylformamid gelöst, die Lösung auf -15° gekühlt und mit N-Methylmorpholin auf pH 8 eingestellt. Die Azidkomponente wird durch Lösen von 1,37 g (3 mmol) Z-Glycyl-L-phenylalanyl-L-serylhydrazid **13** in 6 ml Dimethylformamid, Kühlen auf -15° und tropfenweise Zugabe von 1,5 ml 6N Salzsäure und 0,22 g konz. wässriger Natriumnitritlösung hergestellt und 5 Min. bei derselben Temperatur weitergerührt.

Die Azidlösung wird in die Lösung der Aminkomponente getropft, das Gemisch 1 Std. bei -10° , weitere 3 Std. bei 0° gerührt, dann 24 Std. im Kühlschrank stengelassen. Nach Eindampfen der Lösung wird der Rückstand in Essigester/Wasser gelöst und die organische Phase mit verd. Salzsäure, verd. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Die Lösung wird i. V. eingedampft, der Rückstand in Äther verrieben und das gelbliche, amorphe Pulver durch Fällung aus Methanol/Äther gereinigt: 1,92 g (70%), Smp. 133-137°, $[\alpha]_{25}^D = -36^{\circ}$ ($c = 1$, Dimethylformamid).

$C_{42}H_{56}N_{10}O_{12}$ (917,0) Ber. N 15,3% Gef. N 15,1%

Z-L-Nitroarginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-seryl- α -L-homoprolyl-L-phenylalanyl-L-nitroargininmethylester (16). 1,38 g 14 werden in überschüssiger Trifluoressigsäure gelöst; dann wird unter ständigem Rühren bei 0° 45 Min. lang HBr-Gas durch die Lösung geleitet. Nach Erwärmen auf RT. wird die Lösung i. V. eingedampft, der Rückstand mit Äther verrieben, abfiltriert, mit Äther gewaschen und i. V. getrocknet. Das zurückbleibende Hexapeptid-hydrobromid, 822 mg (1,5 mmol) *Z*-L-Nitroarginyl-L-prolyl-L-prolin und 202 mg (1,5 mmol) HOEt werden in 10 ml Dimethylformamid gelöst, die Lösung auf 0° gekühlt, dann 0,17 ml (1,5 mmol) N-Methylmorpholin und 340 mg (1,65 mmol) DCCI zugegeben. Nach Abfiltrieren des Dicyclohexylharnstoffes wird das Filtrat i. V. zum Trocknen eingedampft, der Rest in Chloroform/Wasser 5:1 gelöst und die organische Phase mit verd. $KHSO_4$ -Lösung, verd. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, getrocknet und die Lösung i. V. eingedampft. Der Rückstand wird in Chloroform gelöst, an einer Kieselgelsäule chromatographiert und mit Chloroform/Methanol unter stufenweiser Steigerung der Methanolkonzentration eluiert: 1,05 g (54%), Smp. 122-130°, $[\alpha]_{25}^D = -52^{\circ}$ ($c = 1$, Dimethylformamid).

$C_{80}H_{81}N_{17}O_{17}$ (1312,4) Ber. N 18,1% Gef. N 18,0%

L-Arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-seryl- α -L-homoprolyl-L-phenylalanyl-L-arginin $3CH_3COOH$ (18). Die Lösung von 750 mg 16 in Dioxan/Methanol 5:1 wird mit 0,2 ml 2N Natriumhydroxid versetzt, 3 Std. bei RT. gerührt und eingedampft. Der Rückstand wird mit 1N Salzsäurelösung verrieben, abfiltriert, mit Wasser, dann mit Essigester gewaschen, getrocknet, der Rückstand in Eisessig/Methanol 2:1 wieder gelöst und in Gegenwart von Pd/C unter mehrmaliger Zugabe von frischem Katalysator hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wird das Filtrat i. V. zur Trockene eingedampft, der Rückstand in Eisessig gelöst und an einer CMC-Säule chromatographisch gereinigt. Das reine Nonapeptidtriacetat wird durch Gradientenelution mit 0,5M Ammoniumacetat (pH 5) gewonnen: 285 mg reines Nonapeptidtriacetat (40%), Smp. 160-165°, $[\alpha]_{25}^D = -80^{\circ}$ ($c = 1$, Eisessig).

$C_{87}H_{75}N_{15}O_{11} \cdot 3CH_3COOH$ (1254,3) Ber. N 16,7% Gef. N 16,4%

Aminosäuren-Analyse: Arg 1,83 Gly 1,0 Hopro 1,02 Phe 1,96 Pro 1,86 Ser 0,87

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. Rudinger, 'Peptides 1963' Proc. 6th European Peptide Symp., Athens, Greece.
- [2] R. Fairweather & J. H. Jones, J. chem. Soc. C, 1972, 2475.
- [3] E. Katchalski, A. Berger & J. Kurtz, Int. Symp. on Protein Structure and Crystallography, Madras, 1963.
- [4] Z. D. Bespalova, O. A. Kairov, U. F. Martinov, V. U. Natosky, M. I. Titov & E. I. Sachmalova, Vest. Leningrad. Univ. Ser. Fiz. Chim. USSR 21, 157 (1966).
- [5] E. D. Nicolaidis, H. A. DeWald & M. K. Craft, Ann. N. Y. Acad. Sci 104, 15 (1963).
- [6] N. C. Chaturvedi, W. K. Park, R. R. Smeby & F. M. Bumpus, J. mod. Chemistry 13, 177 (1970).
- [7] L. Balásperi, B. Penke, J. Petves & K. Kovács, Mh. Chem. 101, 1177 (1970).
- [8] L. Balásperi, Gy. Papp & K. Kovács, Mh. Chem. 103, 581 (1972).
- [9] L. Balásperi, Gy. Papp, P. Pallai & K. Kovács, Acta Phys. et Chem. Szeged, 20, 105 (1974).
- [10] L. Balásperi, B. Penke, Gy. Papp & K. Kovács, Acta Phys. et Chem. Szeged, 20, 465 (1974).
- [11] L. Balásperi, Gy. Papp, B. Penke & K. Kovács, Jahresversammlung des Vercins Ungarischer Chemiker, Debrecen, 1971.
- [12] K. Neuber, L. Balásperi & G. Losse, Mh. Chem. 103, 1575 (1972).
- [13] L. Balásperi, B. Penke, Gy. Papp, P. Pallai, Gy. Dombi & K. Kovács, in Vorbereitung.
- [14] B. Penke, J. Csombos, L. Balásperi, J. Petves & K. Kovács, Helv. 53, 1057 (1970).