

Zur Synthese von Peptiden des Allothreonins

VON HELMUT AROLD und JÜRGEN DORNBERGER¹⁾

Inhaltsübersicht

Es wird die Synthese einiger Dipeptide und eines Tetrapeptids mit N-terminalem Allothreonin beschrieben.

Der Synthese von Peptiden des Allothreonins ist bisher nur wenig Aufmerksamkeit geschenkt worden. Das Allothreonin gehört nicht zu den natürlichen Aminosäuren, und deshalb finden sich bei Durchsicht der Literatur nur wenige Arbeiten zu diesem Gegenstand.

Im Zusammenhang mit Untersuchungen über den enzymatischen Abbau von Peptiden der Allo-Formen einiger Aminosäuren berichten WINITZ et al.²⁾ über die Synthese des L-Allothreonyl-D-alanins. Die Bildung von Allothreoninpeptiden im Gemisch mit den entsprechenden Peptiden des Threonins beobachteten METZLER und Mitarbeiter³⁾ bei der Reaktion von Glycylglycin bzw. Glycylphenylalanin mit Acetaldehyd in Gegenwart von Pyridoxal. Auch das Poly-DL-allothreonin ist dargestellt worden. OKAWA⁴⁾ erhielt es aus O-Benzyl-DL-allothreonin über das N-Carboxyanhydrid und anschließende reduktive Entfernung der Benzylgruppe.

Die Synthese von Peptiden mit N-terminalem Allothreonin gelingt mit Hilfe der Carbodiimid-Methode⁵⁾ aus Z-DL-Allothreonin⁶⁾ bzw. Z-L-

¹⁾ Diplomarbeit J. DORNBERGER, Jena 1962.

²⁾ M. WINITZ, L. BLOCH-FRANKENTHAL, N. IZUMIYA, S. M. BIRNBAUM, C. G. BAHER u. J. P. GREENSTEIN, J. Amer. chem. Soc. **78**, 2423 (1956).

³⁾ D. E. METZLER, J. B. LONGENECKER u. E. E. SNELL, J. Amer. chem. Soc. **76**, 639 (1954).

⁴⁾ K. OKAWA, J. chem. Soc. Japan, pure Chem. Section [Nippon kagaku zassi] **76**, 75 (1955); Chem. Zbl. **1959**, 12, 196.

⁵⁾ J. C. SHEEHAN u. G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1067 (1955).

⁶⁾ P. A. PLATTNER et al., Helv. chim. Acta **40**, 1546 (1957); D. ROSS, CH. SKINNER u. W. SHIVE, J. org. Chem. **24**, 1440 (1959); HOFFMANN-LAROCHE, DAS 1089390.

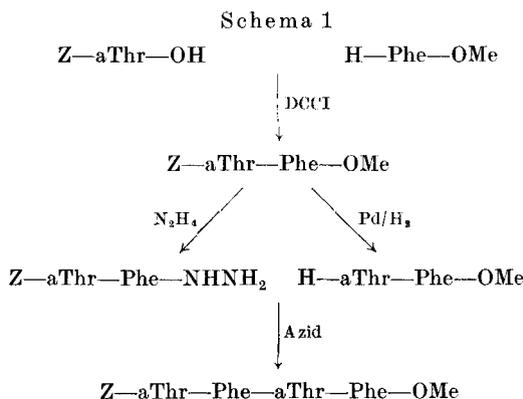
⁷⁾ Verwendete Abkürzungen nach E. BRAND u. J. D. EDSALL, Ann. Rev. Biochemistry **16**, 223 [1947]; aThr = Allothreonin; Z = Carbobenzoxy, = Benzyloxycarbonyl; DCCI = Dicyclohexylcarbodiimid.

Allothreonin²⁾ durch Umsetzung mit Aminosäureestern. Alle Dipeptide sind gut kristallisierende Verbindungen und werden in Ausbeuten von etwa 60–70% erhalten. Siehe Tab. 1.

Z-L-Allothreonin ist frisch dargestellt eine ölige Substanz²⁾. Nach einigem Stehen beginnt jedoch Kristallisation, wobei gleichzeitig der Wert der spezifischen Drehung absinkt. Synthesen mit diesem Produkt führen zu uneinheitlichen Substanzen. Darüber soll demnächst an anderer Stelle berichtet werden.

Die freien Aminosäureester werden aus ihren Hydrochloriden mittels der äquivalenten Menge Triäthylamin gewonnen, bei den Synthesen mit optisch aktivem Allothreonin jedoch zur Entfernung überschüssigen Triäthylamins zunächst zur Trockne eingedampft, um eine mögliche Racemisierung⁸⁾ des Allothreonins zu vermeiden.

Zur Synthese des Tetrapeptides Z—L—*a*Thr—L—Phe—L—*a*Thr—L—Phe—OMe (Schema 1) wird aus dem Dipeptid Z—L—*a*Thr—L—Phe—OMe einerseits durch Umsetzung mit Hydrazinhydrat das Hydrazid hergestellt und andererseits die Carbobenzoxy-Gruppe mit Pd/H₂ hydrogenolytisch abgespalten. Durch Kupplung der beiden Bausteine mit Hilfe der Azid-Methode⁹⁾ wird das Tetrapeptid in reiner, allerdings nicht kristallisierter Form gewonnen. Die Reinheit wurde auf papierchromatographischem Wege geprüft. Nach Abspaltung der Carbobenzoxy-Gruppe mit HBr-Eisessig wird nur ein ninhydrinpositiver Fleck gefunden.



Die Darstellung des L-Allothreonins erfolgte durch Racematspaltung aus dem N-Benzoyl-DL-allothreonin¹⁰⁾ mittels papain-katalysierter enzymati-

⁸⁾ H. ZAHN u. H. SCHÜSSLER, Liebigs Ann. Chem. **641**, 176 (1961).

⁹⁾ TH. CURTIUS, Ber. dtsh. chem. Ges. **35**, 3226 (1902).

¹⁰⁾ SÖRENSEN u. ANDERSEN, Z. physiol. Chem. **56**, 250 (1908); E. ABDERHALDEN u. K. HEYNS, Ber. dtsh. chem. Ges. **67**, 530 (1934).

scher Synthese¹¹⁾¹²⁾ über das Anilid¹³⁾ (Schmp. 226–226,5°, $[\alpha]_D^{21} -11,5^\circ$; $c = 5$ in Pyridin), das p-Toluidid (Schmp. 224–224,5°, $[\alpha]_D^{21} -16,6^\circ$; $c = 5$ in Pyridin) oder das Phenylhydrazid (Schmp. 219–220°, $[\alpha]_D^{21} -113,6^\circ$; $c = 2$ in Pyridin) und nachfolgende saure Verseifung¹⁴⁾.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden in der offenen Kapillare bestimmt und sind nicht korrigiert. Die Drehwerte wurden, falls nicht anders angegeben, bei $c = 2$ in Methanol gemessen. Fehlergrenze $\pm 1^\circ$. Die Analysensubstanzen wurden zuvor bei 0,1 Torr bei 50° bzw. 80° 5 Stunden über P₂O₅ getrocknet.

N-Benzoyloxycarbonyl-DL-allothreonin

Darstellung nach BERGMANN und ZERVAS¹⁵⁾ in Gegenwart von NaHCO₃ oder MgO. Schmp. 123–125°. Lit.⁶⁾ 122–124°; 114–118°; 124°.

N-Benzoyloxycarbonyl-L-allothreonin

Nach WINITZ et al.²⁾ $[\alpha]_D^{18} -2,4^\circ$ ($c = 4$; Methanol).

Die in Tab. 1 angeführten Verbindungen wurden analog den folgenden Vorschriften dargestellt:

N-Benzoyloxycarbonyl-DL-allothreonyl-D-phenylalanin-methylester

Zu einer Lösung von 1,26 g (5 mMol) Z-Allothreonin in 10 cm³ absolutem Tetrahydrofuran werden bei –5 bis –10° eine Lösung von D-Phenylalaninmethylester (dargestellt durch Zugabe von 0,88 cm³ Triäthylamin zu einer Suspension von 1,18 g = 5,5 mMol des Hydrochlorids¹⁶⁾ in Tetrahydrofuran bei 0° und Abfiltrieren der ausgeschiedenen Triäthylammoniumchlorids) sowie 1,33 g (6 mMol) DCCl, gelöst in 15 ml Tetrahydrofuran, gegeben. Die Mischung bleibt 24 Stunden bei –5° stehen. Danach wird vom ausgeschiedenen Dicyclohexylharnstoff abgesaugt und das Lösungsmittel bei 35° im Vakuum abgedampft. Der Rückstand wird mehrfach mit Petroläther gründlich verrieben, in Essigester aufgenommen und die Lösung mit 1 n HCl, Wasser, 1 n NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ wird im Vakuum eingedampft. Ausbeute 1,24 g (60% d. Th.) Schmp. 118–120°.

Zur Analyse wird zweimal aus Essigester/Hexan umkristallisiert. Farblose Nadeln vom Schmp. 124–125°.

C₂₂H₂₆N₂O₆ (414,4) ber.: C 63,75; H 6,32; N 6,76;
gef.: C 64,09; H 6,56; N 6,59.

¹¹⁾ M. BERGMANN u. H. FRAENKEL-CONRAT, J. biol. Chemistry **119**, 707 (1937).

¹²⁾ D. A. DOHERTY u. E. A. POPENOE jr., J. biol. Chemistry **189**, 447 (1951).

¹³⁾ N. F. ALBERTSON, J. Amer. chem. Soc. **73**, 452 [1951].

¹⁴⁾ Diplomarbeit U. WÄHNERT, Jena 1959.

¹⁵⁾ M. BERGMANN u. L. ZERVAS, Ber. dtsh. chem. Ges. **65**, 1192 (1932).

¹⁶⁾ B. F. ERLANGER, H. SACHS u. E. BRAND, J. Amer. chem. Soc. **76**, 1806 (1954).

N-Benzoyloxycarbonyl-L-allothreonyl-D-phenylalanin-methylester

1,18 g (5,5 mMol) D-Phenylalaninmethylester-Hydrochlorid werden in 15 cm³ absolutem Methylenchlorid bei 0° unter Schütteln mit 0,88 cm³ Triäthylamin versetzt. Nach 15 Minuten wird im Vakuum bei möglichst niedriger Temperatur abgedampft und das Abdampfen mit Methylenchlorid noch zweimal wiederholt. Der Rückstand wird mit 15 cm³ absolutem Tetrahydrofuran behandelt und vom Triäthylammoniumchlorid abfiltriert. Zum Filtrat wird bei -10° eine Lösung von 1,26 g (5 mMol) Z-L-Allothreonin in 10 cm³ Tetrahydrofuran und anschließend 1,33 g (6 mMol) DCCl, ebenfalls in 15 ml Tetrahydrofuran gelöst, zugegeben. Nach 24stündigem Stehen bei 0° wird vom ausgeschiedenen Harnstoff abgesaugt, nachgewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum bei 35° abgedampft. Der Rückstand wird nach mehrmaligem Verreiben mit Petroläther in Methylenchlorid aufgenommen und mit 1 n HCl, Wasser, 1 n NaHCO₃-Lösung und Wasser ausgeschüttelt. Es wird über Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels hinterbleiben 1,45 g (70%) Dipeptid vom Schmp. 140–145°. Zur Analyse wird zweimal aus Essigester umkristallisiert. 1,26 g (61%) vom Schmp. 148–151°, $[\alpha]_D^{18} - 12,7^\circ$ (c = 2; Methanol).

C₂₂H₂₆N₂O₆ (414,4) ber.: C 63,75; H 6,32; N 6,76;
gef.: C 63,52; H 6,20; N 6,98.

N-Benzoyloxycarbonyl-DL-allothreonyl-D-phenylalanin

0,2 g (0,5 mMol) Z-DL-aThr-D-Phe-OMe werden in 4 cm³ Methanol gelöst, mit 0,6 cm³ 2 n NaOH versetzt und 3 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Danach wird mit Wasser verdünnt, filtriert und mit 1 n HCl auf pH 2 angesäuert. Nach dem Vertreiben des Methanols im Vakuum scheidet sich beim Stehen im Eisschrank die Dipeptidsäure aus. Nach Umkristallisation aus Alkohol/Wasser werden 90 mg (46%) Z-DL-aThr-D-Phe-OH vom Schmp. 163–165° erhalten.

N-Benzoyloxycarbonyl-L-allothreonyl-L-phenylalanyl-hydrazid

0,207 g (0,5 mMol) Z-L-aThr-L-Phe-OMe (siehe Tab. 1) werden in 2 cm³ Methanol zusammen mit 0,2 cm³ (5 mMol) Hydrazinhydrat kurz erwärmt und 48 Stunden bei 20° belassen. Das auskristallisierte Hydrazid wird abgesaugt, gründlich mit Methanol gewaschen und getrocknet. Ausbeute 0,18 g (87%) vom Schmp. 215°. Zur Analyse wird in wenig Dimethylformamid gelöst und mit Methanol versetzt. Feine Nadeln vom Schmp. 231–233°, $[\alpha]_D^{18} - 13,5^\circ$ (c = 1; Dimethylformamid).

C₂₁H₂₆N₄O₅ (414,6) ber.: C 60,86; H 6,32; N 13,51;
gef.: C 60,37; H 6,43; N 13,29.

L-Allothreonyl-L-phenylalanin-methylester-hydrochlorid

0,414 g (1 mMol) Z-L-aThr-L-Phe-OMe werden in 50 cm³ absolutem Methanol gelöst und in Gegenwart von 0,5 g Pd-Mohr und 1 cm³ Eisessig hydriert. Es wird vom Katalysator abfiltriert, die äquivalente Menge Methanol · HCl zugegeben und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird in absolutem Methanol aufgenommen und das Hydrochlorid durch Zugabe von absolutem Äther gefällt. Nach dem Stehen im Eisschrank wird abgesaugt, mit absolutem Äther nachgewaschen und über P₂O₅ und festem KOH getrocknet. Ausbeute 0,29 g (92%). Schmp. 155–160°, $[\alpha]_D^{18} + 17,0^\circ$. (c = 2; Methanol.)

Tabelle 1
 $\text{CH}_3\text{---CHOH}$
 $\text{Z---NH---CH---CO---R}$

R	Aus- beute in %	Schmp.	Lösungs- mittel	$[\alpha]_D^{18}$ (c = 2; Methanol)	Summenformel	Mol- Gew.	C		H		N	
							ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.
Z-N-aThr -Gly-OEt	67	71-72°	Essigester/ Hexan	--	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6$	338,3	56,79	56,63	6,55	6,54	8,28	8,38
-L-Leu-OMe	65	158-159°	Essigester	--	$\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_6$	380,4	59,58	59,55	7,42	7,30	7,36	7,37
-D-Phe-OMe	60	124-125°	Essigester/ Hexan	--	$\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_6$	414,4	63,75	64,09	6,32	6,56	6,76	6,59
-L-Tyr-OMe	62	144-146°	Essigester/ Hexan	--	$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_7$	430,4	61,38	61,21	6,09	6,67	6,51	6,33
Z-L-aThr -Gly-OEt	70	142-144°	Essigester	- 13,4°	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6$	338,3	56,79	56,33	6,55	6,63	8,28	8,58
-L-Leu-OMe	75	112-114°	Essigester	- 32,5°	$\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_6$	380,4	59,98	60,21	7,42	7,62	7,36	7,41
-L-Phe-OMe	60	140-142°	Essigester	- 13,5°	$\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_6$	414,4	63,75	63,37	6,32	6,58	6,76	7,07
-D-Phe-OMe	70	148-151°	Essigester	- 12,7°	$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6$	414,4	63,75	63,52	6,32	6,20	6,76	6,98
-L-Tyr-OMe	65	164-165°	Essigester	-- 4,6°	$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_7$	430,4	61,38	61,36	6,09	5,78	6,51	6,78

