

ZUR REAKTION VON IMINODITHIOCARBONATEN MIT CARBONSÄUREN I: SYNTHESE DES
MODELLPEPTID-DERIVATES Z-(L)-Ala-(L/D)-Phe-(L)-Val-OMe

Heinz BERNDT

DEUTSCHES WOLFFORSCHUNGSINSTITUT an der Rheinisch-Westfälischen Technischen
Hochschule Aachen, Veltmanplatz 8, D-5100 Aachen

Summary:

The tripeptide derivative Z-(L)-Ala-(L/D)-Phe-(L)-Val-OMe was obtained in 40% yield by reacting $(\text{CH}_3\text{S})_2\text{C}=\text{N}-(\text{L})-\text{CH}-\left[\text{CH}(\text{CH}_3)_2\right]-\text{COOCH}_3$ with the dipeptide derivative Z-(L)-Ala-(L)-Phe-OH and ZnCl_2 at 110°C . The product obtained by bulk condensation contained 9%, the product obtained utilizing ethylene carbonate as solvent contained 10% of the diastereomer Z-(L)-Ala-(D)-Phe-(L)-Val-OMe. Separation of diastereomers was achieved by HPLC on a silicagel column.

N-Alkyl-iminodithiokohlensäure-dialkylester¹⁾ reagieren mit Ketenen unter Cycloaddition zu β -Lactamen^{2,3)}. Umsetzungen von Iminodithiocarbonaten mit Carbonsäuren zu den entsprechenden Säureamiden sind bislang nicht bekannt⁴⁾.

Im Hinblick auf die Entwicklung thermisch induzierter Kondensationsreaktionen⁵⁻⁸⁾ als Synthesemethode zur gezielten Darstellung biologisch aktiver Polypeptid-Derivate ist ein sterisch einheitlicher Verlauf der Kondensationsreaktionen von besonderem Interesse. Der Diastereomerengehalt des Dipeptid-Derivates Z-(L)-Ala-(L/D)-Phe-OH läßt sich mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie^{9,10)} quantitativ bestimmen. In Vorversuchen ließen sich die jeweiligen diastereomeren Tripeptid-Derivate Z-(L)-Ala-(L)-Phe-(L)-Val-OMe und Z-(L)-Ala-(D)-Phe-(L)-Val-OMe quantitativ mittels HPLC trennen. Als Modellreaktion wurde die thermisch induzierte Umsetzung der Dipeptidsäure Z-(L)-Ala-(L)-Phe-OH mit dem Iminodithiocarbonat des (L)-Valinmethylesters³⁾ zum Tripeptid-Derivat Z-(L)-Ala-(L/D)-Phe-(L)-Val-OMe untersucht. Die diastereomeren Modellpeptid-Derivate Z-(L)-Ala-(L)-Phe-(L)-Val-OMe (A) und Z-(L)-Ala-(D)-Phe-(L)-Val-OMe (B) wurden ausgehend von dem jeweiligen Dipeptid-Derivat Z-Ala-Phe-OH [L-L] bzw. [L-D] mit H-(L)-Val-OMe nach der Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol-Methode¹¹⁾ dargestellt - s.Tab.: 1-. Die Diastereomerentrennung der Referenzpeptid-Derivate wurde mittels HPLC an einer Knauer-Säule: Si-60, 5 μm $l=25$ cm durchgeführt. Elutionsbedingungen: Chloroform⁺Methanol 99:1, isokratisch, 2 ml/min. Das Dipeptid-Derivat Z-(L)-Ala-(L)-Phe-OH wurde mit dem Iminodithiocarbonat des (L)-Valinmethylesters³⁾, $(\text{CH}_3\text{-S})_2\text{C}=\text{N}-(\text{L})-\text{CH}-\left[\text{CH}(\text{CH}_3)_2\right]-\text{COOCH}_3$, in Gegenwart stöchiometrischer Mengen Zinkchlorid, sowohl in Sub-

stanz (Methode II) als auch in Ethylencarbonat als Lösungsmittel (Methode III) bei einer Reaktionstemperatur von 110°C innerhalb 16 h mit einer Ausbeute von 40 % zum Tripeptid-Derivat Z-(L)-Ala-(L/D)-Phe-(L)-Val-OMe (D,E) umgesetzt. Der Diastereomerenanteil beträgt 9 bzw. 10 % - s.Tab.: 1-. Unterhalb einer Reaktionstemperatur von 100°C wurde keine merkliche Umsetzung beobachtet. Bei Abwesenheit von Zinkchlorid werden "Ausbeuten" von 1,5 % mit einem Diastereomerenanteil von 21.6 % erzielt (Methode I, Verbindung C). Mit den Ausgangs- und Endprodukten (Tripeptid) wurden Stabilitätsuntersuchungen - 110°C, 16 h - in Substanz und in Ethylencarbonat als Lösungsmittel sowohl ohne als auch in Gegenwart eines Äquivalentes Zinkchlorid durchgeführt. Die untersuchten Produkte überstehen die thermische Behandlung in Abwesenheit von Zinkchlorid unverändert. Bei den in Gegenwart von Zinkchlorid durchgeführten Stabilitätsuntersuchungen entstanden Abbauprodukte, die von den Ausgangsmaterialien abgetrennt wurden. Die jeweiligen dabei in durchschnittlich 80 %iger Ausbeute wiedergewonnenen Ausgangsmaterialien wurden an Hand ihrer physikalischen Daten als optisch einheitliche Derivate der Form Z-(L)-Ala-(L)-Phe-OH, $(\text{CH}_2-\text{S})_2\text{C}=\text{N}-(\text{L})-\text{CH}-\left[\text{CH}(\text{CH}_3)_2\right]-\text{COOCH}_3$ und Z-(L)-Ala-(L)-Phe-(L)-Val-OMe identifiziert. Racemisierung der Ausgangs- und Endprodukte durch das Reaktionsmedium kann somit ausgeschlossen werden. Eine Identifizierung der Abbauprodukte steht noch aus. Läßt man HBr x H-(L)-Val-OMe in Gegenwart je eines Äquivalentes N-Methylmorpholin und Zinkchlorid sowohl in Substanz als auch in Ethylencarbonat 16 h bei 110°C im verschlossenen Kolben stehen (Methode IV), so wird das Tripeptid-Derivat Z-(L)-Ala-(L)-Phe-(L)-Val-OMe (F) in 7 %iger Ausbeute diastereomerenfrei gebildet. Bei längeren Reaktionszeiten als 16 h treten Abbaureaktionen, insbesondere die in Gegenwart von Zinkchlorid beobachtete Abspaltung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe⁺⁺⁺⁾ und die daraus resultierenden Folgeprodukte¹²⁾ in den Vordergrund.

Tripeptid-Derivate enthaltende Reaktionsansätze wurden in Ethylacetat aufgenommen und nach alkalischer und saurer Extraktion an Lobar[®]-Fertigsäulen - Größe B, Si-60, 40-63 µm in Chloroform/Methanol 100:1 bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 40 ml/h chromatographiert und in analysenreiner Form isoliert. Testläufe mit einem diastereomeren Tripeptid-Gemisch ergaben, daß eventuell vorhandene Diastereomerenanteile mit Säulenmaterial dieser Korngröße (40-63 µm) nicht abgetrennt werden. Die zu Kondensationen eingesetzten Dipeptidsäuren Z-(L)-Ala-(D)-Phe-OH und Z-(L)-Ala-(L)-Phe-OH erwiesen sich bei der ¹H-NMR-Spektroskopie in CDCl₃ als diastereomerenfrei. Der jeweilige Diastereomerenanteil der über die Iminodithiocarbonat-Methode dargestellten Tripeptid-Derivate wurde analog wie bei den entsprechenden Referenztripeptid-Derivaten mittels HPLC bestimmt. Vergleichende Bestimmungen des Gehaltes an D-Aminosäuren durch D-Aminosäureoxidase-Abbau¹³⁻¹⁵⁾ entsprechender Totalhydrolysate zeigten an, daß bei der Iminodithiocarbonat-Methode nur das Phenylalanin eine teilweise Konfigurationsumkehr erleidet.

Tab. 1: Vergleich der Kupplungsmethoden hinsichtlich Ausbeute und Stereoselektivität

Verbindung	Synthesemethode	Ausb. %	% Diastereomerenanteil bestimmt durch HPLC		
			D-Aminosäureoxidase		
A: Z-(L)-Ala-(L)-Phe-(L)-Val-OMe	DCC/HOBT	54	0	+0,3	0 ± 3
B: Z-(L)-Ala-(D)-Phe-(L)-Val-OMe	DCC/HOBT	26	0	+0,3	0 ± 3
C: Z-(L)-Ala-(L/D)-Phe-(L)-Val-OMe	I	1,5	21,6	+0,3	n.b.
D: Z-(L)-Ala-(L/D)-Phe-(L)-Val-OMe	II	35	9,0	+0,3	8 ± 3
E: Z-(L)-Ala-(L/D)-Phe-(L)-Val-OMe	III	40	10,0	+0,3	11 ± 3
F: Z-(L)-Ala-(L)-Phe-(L)-Val-OMe	IV	7,0	0	+0,3	n.b.

Tab. 2: Analysendaten⁺⁺) der nach verschiedenen Methoden dargestellten Tripeptid-Derivate

Substanz	$[\alpha]_D^{23}$ c=1/MeOH	Schmp.: °C	Ala (1)	Phe (1)	Val (1)
A	-47,0 ± 0,5	144-146	1.00	0,92	0,99
B	-15,0 ± 0,5	52- 54	1.00	0,96	1.01
D	-44,0 ± 0,5	93- 96	1.00	0,94	1.08
E	-43,8 ± 0,5	95- 96	1.00	0,96	1.04

Der Befund, daß sich die Dipeptidsäure Z-(L)-Ala-(L)-Phe-OH mit dem Aminosäureester H-(L)-Val-OMe unter analogen Bedingungen wie das entsprechende Iminodithiocarbonat des (L)-Valinmethylesters jedoch nur mit 7 % zum gewünschten Tripeptid-Derivat umsetzt, läßt den Schluß zu, daß der Reaktion des Iminodithiocarbonates zum Tripeptid-Derivat keine Zersetzung des Iminodithiocarbonates zum Aminosäuremethylester, der dann mit der Dipeptidsäure zum Tripeptid abreagieren könnte, vorgelagert ist. Experimentelle Befunde, die Rückschlüsse auf den Reaktionsmechanismus, insbesondere die Bedeutung des für den Ablauf der Reaktion erforderlichen Zinkchlorids, zulassen, liegen noch nicht vor. Der Zusatz stöchiometrischer Mengen Zinkchlorid verbessert sowohl die Ausbeute als auch die Stereoselektivität der Reaktion. Die gleichzeitig durch die Lewisäure verursachte partielle Amino-Schutzgruppenabspaltung und die daraus resultierenden Nebenreaktionen¹²⁾ erfordern weitere Untersuchungen des Systems mit weicheren Lewisäuren als Zinkchlorid mit dem Ziel, die Amidausbeute bei möglichst hoher Stereoselektivität zu erhöhen.

- 1) M. Delépine, Bull.Soc.Chim. France 1902, 48
- 2) Metzger und R. Wegler, Chem.Ber. 101, 1120 (1968)
- 3) D.F. Sullivan, D.J.C. Scopes, A.F. Kluge und J.A. Edwards, J.Org.Chem. 41, 1112 (1976)
- 4) C. Metzger und R. Wegler, Chem.Ber. 101, 1136 (1968)
- 5) M. Sakarellos-Diatsiotis, C. Gilon, C. Sakarellos und M. Goodman J.Amer.Chem.Soc. 98, 7105 (1976)
- 6) D. Nissen, C. Gilon und M. Goodman, Makrom.Chem.Suppl. 1, 23 (1975)
- 7) P.A. Finot, P. Hirsbrunner und R. Bertholet, Can.-Pat. 1.055.046 22.05.1979 [C.A. 91, 108237 a (1979)]
- 8) G. Matoni und H. Berndt, Tetrahedron Lett. 21, 37 (1980)
- 9) B. Weinstein und A.E. Pritchard, J.C.S. Perkin I, 1972, 1015
- 10) B. Halpern, L.F. Clew und B. Weinstein, J.Amer.Chem.Soc. 89, 5051 (1967)
- 11) W. König und R. Geiger, Chem.Ber. 103, 788 (1970)
- 12) G. Schramm und H. Restle, Makrom.Chem. 13, 103 (1954)
- 13) D.M. Larson, D.C. Snetsinger und P.E. Waibel, Anal.Biolog. 39, 395 (1971)
- 14) J. Gebhardt und H. Zahn, Diplomarbeit RWTH Aachen (1979)
- 15) E. Jäger, Max-Planck-Institut für Biochemie München, Privatmitteilung

+¹) stabilisiert mit 4750 ppm Ethanol und 250 ppm Wasser

+²) Alle Tripeptid-Derivate zeigten zutreffende Elementaranalysen

+³) Z = Benzyloxycarbonyl

(Received in Germany 17 March 1980)