

Untersuchungen zur proteasekatalysierten und chemischen Peptidbindungs- knüpfung mit α -trifluormethylsubstituierten α -Aminosäuren [1]

Klaus Burger, Kerstin Mütze und Wolfgang Hollweck

Garching, Organisch-Chemisches Institut der Technischen Universität

Beate Koks, Peter Kuhl und Hans-Dieter Jakubke

Leipzig, Fachbereich Biowissenschaften, Institut für Biochemie der Universität

Jürgen Riede und Annette Schier

Garching, Anorganisch-Chemisches Institut der Technischen Universität

Eingegangen am 24. August 1992 bzw. 15. Januar 1993

Protease Catalyzed and Chemical Peptide Bond Formation with α -Trifluoromethyl Substituted α -Amino Acids

Abstract. Subtilisin, α -chymotrypsin and papain catalyzed hydrolyses of α -trifluoromethyl substituted N-benzyloxycarbonyl amino acid methylesters (Z-TFM-Xaa-OMe) **1** can be achieved only in the case of 3,3,3-trifluoroalanine. Enzymatic incorporation of Z-TFM amino acids **2** into N-terminal position of dipeptides also fails. In contrary, dipeptides with a TFM amino

acid moiety in N-terminal position, e. g. TFM-Phg-L-Phe-OMe **5**, react with H-Leu-NH₂ to give the corresponding tripeptides **6** in high yield. Z protected dipeptide derivatives **8** with N-terminal TFM amino acids can be obtained via 4-trifluoromethyl-5-(4H)-oxazolones **7**.

Die Synthese von Peptiden durch Kombination proteogener Aminosäuren mit artifiziellen Bausteinen stellt im Hinblick auf die Gewinnung bioaktiver Wirkstoffe mit neuen oder modifizierten Eigenschaften eine für die Entwicklung von Peptidpharmaka besondere Herausforderung dar. Nachdem mit der aminolytischen Öffnung von trifluormethylsubstituierten N-Carboxyanhydriden [2] ein Syntheseweg für Dipeptidderivate mit N-terminaler α -trifluormethylsubstituierter α -Aminosäure (TFM-Aminosäure) vorgestellt wurde, werden nachfolgend weitere Möglichkeiten beschrieben, die sich für den N-terminalen Einbau von TFM-Aminosäuren in Peptide eignen.

Aus der Vielzahl vorhandener Methoden zur Knüpfung von Peptidbindungen kommt den enzymatischen Varianten aufgrund der spezifischen Eigenschaften der Biokatalysatoren besondere Bedeutung zu [3 – 5].

N-Geschützte α -trifluormethylsubstituierte α -Aminosäuren [6 – 9] sind bisher noch nicht hinsichtlich ihrer Eignung als Carboxylkomponenten für proteasekatalysierte Peptidsynthesen untersucht worden. Fer-

ner sollte geprüft werden, ob die für konventionelle Peptidsynthesen oft eingesetzte Mischanhydrid-Methode [10] auch zur Carboxylgruppen-Aktivierung von α -trifluormethylsubstituierten α -Aminosäuren geeignet ist.

Eine notwendige Voraussetzung für den Einsatz von Z-TFM-Xaa-OR **1** für proteasekatalysierte kinetisch kontrollierte Peptidsynthesen [11] ist eine hinreichende Hydrolyselabilität der Alkylestergruppierung, da die Ausbildung eines kovalenten Acylenzym-Intermediats für den genannten Reaktionsablauf essentiell ist. Die Ergebnisse der unter pH-Stat-Bedingungen durchgeführten enzymkatalysierten Hydrolysestudien sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Aufgrund der ausgeprägten Spezifität der zur Hydrolyse eingesetzten Enzyme wurden Substrate, denen das α -ständige Wasserstoffatom fehlt, nur in stark eingeschränktem Maße akzeptiert. Sowohl der Umsatz als auch die Hydrolysegeschwindigkeit nehmen in der Reihenfolge Z-TFM-Gly-OMe **1a** > Z-TFM-Gly(OH)-OMe **1b** > Z-TFM-Ala-OMe **1c** ab. Offenbar ist

Tabelle 1 Proteasekatalysierte Hydrolyse von α -trifluormethylsubstituierten Aminosäure- und Peptidestern

Substrat	Enzym	Umsatz ^{a)} (%)	spez. Aktivität (nkat mg ⁻¹)
Z-TFM-Gly-OMe (1a)	Subtilisin	45	420
	α -Chymotrypsin	44	9
	Papain	60	600
Z-TFM-Gly(OH)-OMe (1b)	Subtilisin	43	0,5
	α -Chymotrypsin	0	–
	Papain	0	–
Z-TFM-Ala-OMe (1c)	Subtilisin	14	0,5
	α -Chymotrypsin	0	–
	Papain	0	–
Z-TFM-Leu-OMe (1d)	Subtilisin	7	0,01
	α -Chymotrypsin	0	–
	Papain	0	–
Z-TFM-Phe-OMe (1e)	Subtilisin	0	–
	α -Chymotrypsin	0	–
	Papain	0	–
H-TFM-Phg-Phe-OMe (5)	Subtilisin	88	36
	α -Chymotrypsin	86	81

^{a)} titrimetrisch bestimmt

aus vorrangig sterischen Gründen die Bildung des Acyl-Enzyms bei Aminosäureestern vom „ α -Alkyltyp“ mit zunehmendem Raumanspruch des Substituenten erschwert. Bei **1d** und **1e** gelingt eine enzymatische Hydrolyse schließlich nur noch in untergeordnetem Maße bzw. überhaupt nicht mehr.

Zusätzlich belegen die Ergebnisse der chemischen Verseifung von **1d** und **1e** (siehe Tab. 2), daß selbst bei pH 9 keine signifikante Verseifung erfolgt. Dagegen wird unter diesen Reaktionsbedingungen Z-Phe-OMe innerhalb von 5 min vollständig hydrolysiert. Der einzige α -TFM-Aminosäureester, der von allen drei eingesetzten Enzymen als Substrat akzeptiert wurde, ist **1a** mit dem für die enzymatische Reaktion essentiellen α -Wasserstoffatom. Damit eröffnet sich

durch die selektive enzymatische Hydrolyse von **1a** eine einfache präparative Möglichkeit der Enantiomerentrennung.

Die enzymatische Hydrolyse von **1b** mit Subtilisin verläuft zwar ebenfalls bis zu einem Umsatz von etwa 50 %, jedoch mit deutlich geringerer Geschwindigkeit. Es ist damit möglich, auch diesen Ester auf analogem Wege einer Enantiomerentrennung zuzuführen.

Enzymkatalysierte Peptidsynthesen werden in der Regel vorteilhaft im pH-Bereich von 8 bis 9,5 durchgeführt, da unter diesen Bedingungen die nucleophile Aminokomponente in höherer Konzentration in der reaktionsbereiten deprotonierten Form vorliegt. Die in Tab. 2 aufgeführten Ergebnisse der chemischen Hydrolyse zeigen, daß zwar **1a** und **1b** hydrolytisch umgesetzt werden, die gewünschte Säure jedoch nur in Spuren gebildet wird. Dafür entsteht im Fall von **1a** vorrangig ein Nebenprodukt durch hydrolytischen Abbau der Trifluormethylgruppe [12]. Wie bereits erwähnt, erwiesen sich **1c** – **1e** unter diesen Bedingungen als hydrolyseresistent, während **1b** zu etwa 40 % hydrolytisch in ein Nebenprodukt überführt wurde. Die Analyse der Hydrolysestudien führt zu dem Resultat, daß **1a** unter Enzymkatalyse bei pH 6 selektiv zu (R)-Z-TFM-Gly-OH **2a** hydrolysiert werden kann. Die Instabilität im alkalischen Bereich erlaubt jedoch unter solchen Bedingungen keine kontrollierten Umsetzungen. Ähnliches gilt, etwas eingeschränkt, auch für **1b**. Die Verbindungen vom „ α -Alkyltyp“ sollten daher aufgrund der ermittelten Hydrolysebeständigkeit für proteasekatalysierte kinetisch kontrollierte Peptidsynthesen kaum geeignet sein. Dies konnte am

Tabelle 2 Alkalische Hydrolyse von N-geschützten Aminosäuremethylestern bei pH 9

Substrat	t (min)	Umsatz (%)	v (μ mol min ⁻¹)	HPLC (%)		NP ^a
				Säure	Ester	
Z-Phe-OMe	5	100	89	100	0	0
1a	5	380 ^{b)}	132	4	4	92
1b	60	93 ^{b)}	38	2	61	37
1c	30	9	8,6	6	94	0
1d	20	11	6	0	87	0
1e	20	5	7,5	4	96	0

^{a)} nicht näher charakterisiertes Nebenprodukt

^{b)} der angegebene Umsatz resultiert vorwiegend aus dem hydrolytischen Abbau der Trifluormethylgruppe

Beispiel der Umsetzung von **1e** bzw. Z-Phe-OMe mit H-Leu-NH₂ unter Katalyse von Chymotrypsin bestätigt werden. Während mit Z-Phe-OMe bei einem C/N-Verhältnis von 1:2 vollständiger Umsatz zum Z-Phe-Leu-NH₂ erzielt wurde, konnte bei Einsatz von **1e** auch nach wesentlich längeren Reaktionszeiten sowie drastischer Erhöhung der Enzym- und Nucleophil-Konzentration kein Substratumsatz festgestellt werden.

Neben der proteasekatalysierten kinetisch kontrollierten Peptidsynthese-Strategie können ausgehend von N-geschützten Aminosäuren bzw. Peptiden Knüpfungen von Peptidbindungen auch gleichgewichtskontrolliert erfolgen [3–5]. Entsprechend nachstehendem Reaktionsschema sollten unter Variation der Reaktionsbedingungen Dipeptidsynthesen mit **2c** – **2e** durchgeführt werden.

Die Auswertung der Reaktionen erfolgte mittels HPLC. In keinem Fall konnten die drei verschiedenen Carboxylkomponenten mit Leucinamid zur Reaktion gebracht werden. Analytische Proben der drei zu erwartenden Peptidderivate **3a** – **3c** wurden nach der Mischanhydrid-Methode hergestellt. Unter den gleichen Reaktionsbedingungen ergaben die zur Kontrolle durchgeführten thermolysinkatalysierten Umsetzungen von Z-Ala-OH bzw. Z-Phe-OH mit H-Leu-NH₂ Dipeptidausbeuten von 80 bzw. 98 %.

Im einzelnen wurden folgende Reaktionsmedien verwendet:

a) wäßrig-organische Pufferlösung

2c – **2e** (0,1 M) und H-Leu-NH₂ (1 M) werden in einer Mischung aus Trispuffer (0,2 M; pH 7) und 0,4 ml Methanol gelöst, der pH-Wert mit 6 N HCl korrigiert und ein Endvolumen von 1 ml eingestellt. Nach Zugabe von 10 mg (0,3 µmol) Thermolysin wird 20 h bei 37 °C gerührt.

b) biphasisches System

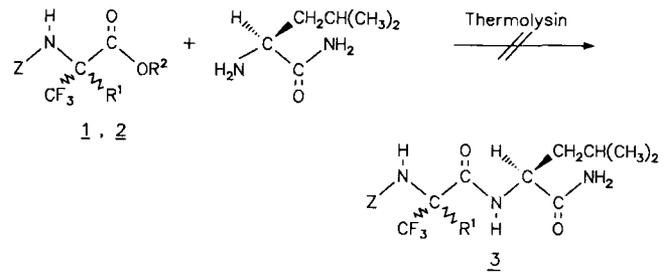
2c – **2e** (5 mM) und H-Leu-NH₂ (5–50 mM; die Konzentrationen der Reaktanten beziehen sich auf das Gesamtvolumen aus organischer und wäßriger Phase) werden in Trispuffer (0,2 M; pH 7) gelöst, der pH-Wert mit 6 N HCl korrigiert und die wäßrige Phase auf ein Endvolumen von 1 ml gebracht. Nach Zugabe von 10 mg (0,3 µmol) Thermolysin und 19 ml Essigester wird 20 h bei 37 °C gerührt.

c) System Hexan/Salzhydrat unter Anwendung von Ultraschall

29,1 mg (0,1 mmol) **2c** und 13,1 mg (0,1 mmol) H-Leu-NH₂ werden mit einer Mischung von 5 mg Thermolysin und 65 mg (0,2 mmol) Na₂SO₄ · 10 H₂O in 2 ml Hexan suspendiert und bei 37 °C 10 min mit einem Ultraschallgerät Labsonic U (20 kHz, 350 W; Firma Braun, BRD) beschallt.

Die Ergebnisse lassen die Schlußfolgerung zu, daß α-trifluormethylsubstituierte α-Aminosäurederivate ohne α-H-Atom enzymkatalysiert nicht unmittelbar mit anderen Aminosäure- und Peptidderivaten verknüpft werden können.

Formelschema 1



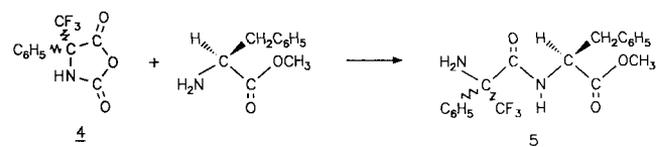
1	R ¹	R ²
a	H	OCH ₃
b	OH	OCH ₃
c	CH ₃	OCH ₃
d	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	OCH ₃
e	CH ₂ C ₆ H ₅	OCH ₃

2	R ¹	R ²
a	H	H
b	OH	H
c	CH ₃	H
d	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	H
e	CH ₂ C ₆ H ₅	H
f	C ₆ H ₅	H

Zwangsläufig bietet sich als Alternative eine enzymkatalysierte Verknüpfung von N-geschützten oder freien Peptidderivaten an, in welchen sich die TFM-Aminosäure in N-terminaler Position befindet. Unter diesen Bedingungen kann sogar auf eine N-terminale α-Aminoschutzgruppe in der Carboxylkomponente verzichtet werden, weil das nucleophile Potential der freien Aminogruppe der TFM-Aminosäure im Vergleich zur freien Aminofunktion der Aminokomponente zu gering ist [2, 13], um kompetitiv in Reaktion treten zu können.

Zur Verdeutlichung dieser Strategie haben wir in Analogie zu bereits publizierten Ergebnissen [2] zunächst das N-Carbonsäureanhydrid von TFM-Phenylglycin **4** mit H-Phe-OMe zum Dipeptidester **5** geöffnet, der nach Reinigung an Kieselgel 60 und nachfolgender Kristallisation aus Ether/Hexan in diastereomerenreiner Form erhalten werden konnte.

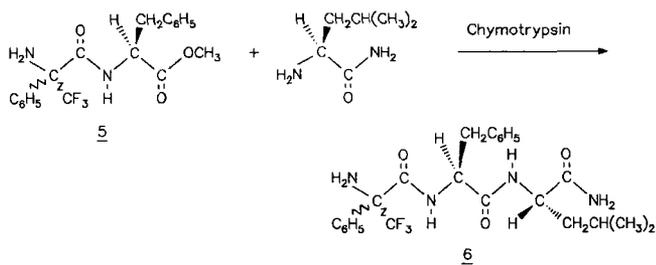
Formelschema 2



5 ist ein vorzügliches Substrat sowohl für Chymotrypsin als auch für Subtilisin (vgl. Tab. 1). Die Umsetzung mit H-Leu-NH₂ unter Chymotrypsin-Katalyse nach Morihara und Oka [14] führte bereits nach 30 min zum Tripeptidester **6** in einer Ausbeute von 86 %.

Trotz der freien Aminofunktion in der eingesetzten C-Komponente konnten mittels HPLC keine Nebenprodukte nachgewiesen werden. Damit ist ein Weg aufgezeigt, der racemisierungssichere Segmentverknüpfungen mit TFM-Aminosäuren erlaubt.

Formelschema 3

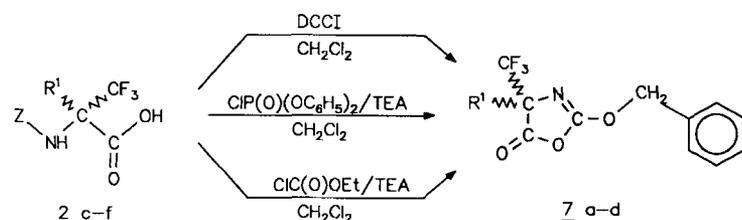


Aufgrund der oben beschriebenen nicht realisierbaren direkten enzymkatalysierten Aktivierung von N-geschützten TFM-Aminosäuren **2** erschien es angebracht, neben der Aufspaltung von NCA-TFM-Xaa [2] weitere chemische Möglichkeiten für Peptidsynthesen zu testen. Die in der konventionellen Peptidsynthese vielbenutzte Mischanhydrid-Methode [10] bietet

den Vorteil einer relativ einfachen experimentellen Handhabung. Die nicht in allen Fällen verifizierbare Racemisierungssicherheit spielt bei Verwendung enantiomerenreiner Z-TFM-Xaa-OH **2** ohnehin nur im Falle von 3,3,3-Trifluoralanin **2a** eine Rolle, da alle anderen TFM-Aminosäuren kein α -H-Atom besitzen. Unter diesem Aspekt sind auch racemisierungsgefährdete Peptidknüpfungsverfahren für den Einbau von TFM-Aminosäuren interessant.

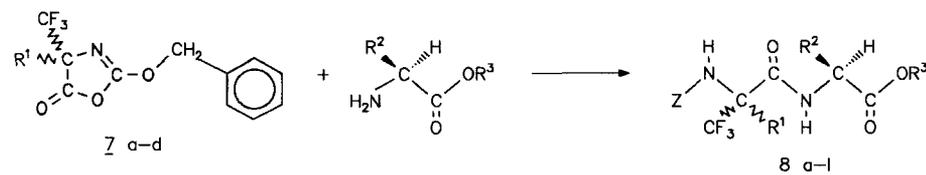
Bei der Mischanhydrid-Methode wird eine N-terminal geschützte Aminosäure oder ein N-terminal geschütztes Peptid mit einem Chlorameisensäurealkylester in Gegenwart einer tertiären Base in das gemischte Anhydrid überführt [10]. Die Regiochemie der aminolytischen Aufspaltung des gebildeten gemischten Anhydrids ist von der Elektrophilie der beiden konkurrierenden Carboxyl-Kohlenstoffatome und von sterischen Effekten abhängig. Als Nebenreaktion kann hierbei u. U. auch der nucleophile Angriff der Aminokomponente am Carboxyl-Kohlenstoffatom

Formelschema 4



Z	R ¹
c	CH ₃
d	CH ₂ CH(CH ₃) ₂
e	CH ₂ C ₆ H ₅
f	C ₆ H ₅

Z	R ¹
a	CH ₃
b	CH ₂ CH(CH ₃) ₂
c	CH ₂ C ₆ H ₅
d	C ₆ H ₅



	R ¹	R ²	R ³
8a	CH ₃	H	CH ₃
8b	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	CH ₃
8c	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	CH ₃
8d	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃	C(CH ₃) ₃
8e	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₂ C ₆ H ₅	C(CH ₃) ₃
8f	CH ₂ C ₆ H ₅	H	CH ₃
8g	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃	C(CH ₃) ₃
8h	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃
8i	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ SCH ₃	CH ₃
8j	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	C(CH ₃) ₃
8k	C ₆ H ₅	CH ₃	C(CH ₃) ₃
8l	C ₆ H ₅	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃

der durch den Chlorameisensäurealkylester eingebrachten Substruktur stattfinden, wobei die N-geschützte Aminosäure wieder freigesetzt wird. Als unerwünschtes Nebenprodukt entsteht dann ein Urethan. Über Einfluß des Lösungsmittels, der eingesetzten tertiären Base sowie einer Reihe anderer Faktoren auf den Reaktionsverlauf liegen Untersuchungen vor [15].

Bei der Carboxylgruppen-Aktivierung Z-geschützter TFM-Aminosäuren **2** durch die Mischanhydrid-Methode wurden bislang mit dem System Methylenchlorid / Triethylamin / Chlorameisensäureethylester die besten Ergebnisse erzielt. Chlorameisensäureethylester bietet den Vorteil, daß als Nebenprodukte lediglich Ethanol und CO₂ entstehen. Die ¹⁹F-NMR-spektroskopische Verfolgung der Reaktion im Temperaturbereich von 0 bis +20 °C zeigt, daß die eingesetzten Z-TFM-Aminosäuren **2** in Minutenfrist vollständig reagieren. Die entstehenden Zwischenprodukte können isoliert und anhand ihrer spektroskopischen Daten zweifelsfrei als 2-Benzoyloxy-4-trifluormethyl-5(4H)-oxazolone **7** identifiziert werden. Die gemischten Anhydride der Z-TFM-Aminosäuren unterliegen somit in dem untersuchten Temperaturbereich spontan einem

intramolekularen Ringschluß. Die Verbindungen **7** sind im Gegensatz zu den von konventionellen Aminosäuren abgeleiteten 2-Alkoxy-5(4H)-oxazolonen [16, 17] außerordentlich stabil. Sie können säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt und tagelang bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Die Stabilität ist zweifellos auf den Ersatz des an C-(4) gebundenen Wasserstoffs durch eine Trifluormethylgruppe zurückzuführen.

Ebenso wird bei der Carboxylgruppen-Aktivierung der Z-TFM-Aminosäuren **2** mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI) oder Chlorphosphorsäurediphenylester / Triethylamin die Zwischenstufe **7** durchlaufen. Eine Isolierung der Zwischenstufe **7** bringt keine höheren Ausbeuten, so daß die Reaktion **2** → **7** → **8** vorteilhaft als „Eintopfreaktion“ durchgeführt werden kann.

Die aminolytische Ringöffnung von **7** gelingt auch mit Dipeptidestern in befriedigenden Ausbeuten. Der Z-geschützte Tripeptidester Z-TFM-Ala-Gly-L-Phe-OBn **9** wird auf diesem Wege zu 55 % erhalten.

Die Ergebnisse zeigen, daß die verschiedenen Aktivierungsmöglichkeiten für **2**, die über die Zwischenstufe **7** verlaufen, aus präparativer Sicht der NCA-Methode [2] nahezu gleichwertig sind. Erstere Methode

Tabelle 3 Physikalische und analytische Daten der Verbindungen **7a** – **7d**

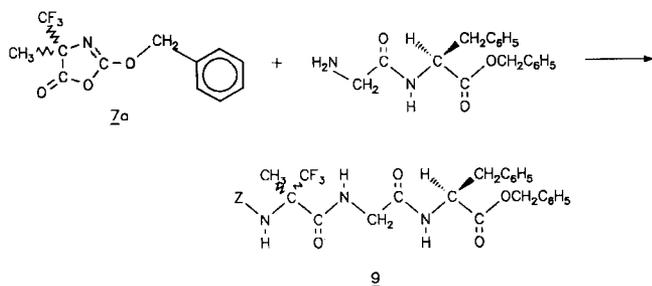
	Summenformel	Molmasse	Ausb. (%)	Meth.	Kp. [°C/Torr] Fp. [°C]	Elementaranalyse			
						C	H	N	
7a	C ₁₂ H ₁₀ F ₃ NO ₃	273,2	75	A	105/0,9	Ber.	52,76	3,69	5,13
						Gef.	52,42	3,99	5,26
7b	C ₁₅ H ₁₆ F ₃ NO ₃	315,3	80	B	35–36	Ber.	57,14	5,12	4,44
			70	C		Gef.	57,17	5,11	4,56
7c	C ₁₈ H ₁₄ F ₃ NO ₃	349,3	88	B	Öl	Ber.	61,89	4,04	4,01
			85	C		Gef.	61,95	3,96	3,98
7d	C ₁₇ H ₁₂ F ₃ NO ₃	335,3	88	B	Öl	Ber.	60,90	3,61	4,18
			76	C		Gef.	61,05	3,66	4,20

Tabelle 4 IR- (ν-Werte in cm⁻¹), ¹³C-NMR (360 MHz, CDCl₃) und ¹⁹F-NMR (250 MHz, CDCl₃) Daten für **7a** – **7d** (δ-Werte in ppm, J in Hz)

	IR (Film)	R ¹	¹³ C-NMR CF ₃	C-2	C-4	C-5	¹⁹ F-NMR CF ₃
7a	1840, 1675	18,34 (q, J = 1,0)	122,87 (q, J = 283,1)	160,31	71,94 (q, J = 29,9)	170,19	0,26 (s)
7b	1845, 1670	22,55; 23,85; 23,93; 38,76	122,89 (q, J = 284,2)	160,18	75,31 (q, J = 28,2)	170,61	1,01 (s)
7c	1835, 1675	36,78; 127,96; 128,45; 130,41; 131,21	122,66 (q, J = 283,7)	160,08	76,65 (q, J = 28,3)	169,00	2,04 (s)
7d	1835, 1675	127,34 (q, J = 0,6); 128,89; 130,01; 130,05	122,17 (q, J = 284,1)	160,25	75,83 (q, J = 30,1)	168,50	2,39 (s)

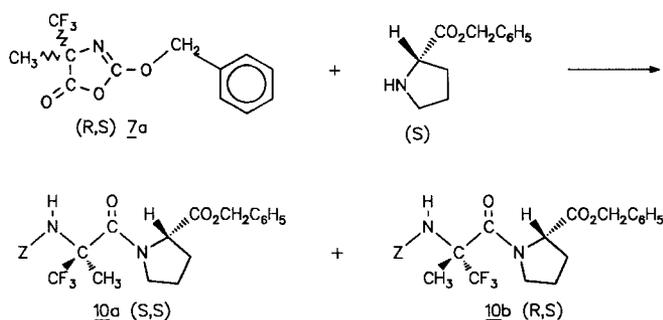
liefert die Z-geschützten, letztere jedoch bereits die freien Peptidester.

Formelschema 5



Da die TFM-Aminosäuren **2** in der vorliegenden Arbeit als Racemate, die konventionellen Aminosäuren jedoch in der L-Form eingesetzt werden, fallen die Peptide jeweils als Diastereoisomerengemische im Verhältnis 1:1 an. Diese können durch fraktionierende Kristallisation, Säulenchromatographie bzw. HPLC getrennt werden. Durch die L-Aminosäuren liegen in den Peptiden jeweils Referenz-Chiralitätszentren vor, so daß die Konfiguration der TFM-Aminosäure in den diastereomerenreinen Peptiden durch Röntgen-Strukturanalyse ermittelt werden kann. Als Modellverbindung für die röntgenographische Konfigurationsbestimmung einer TFM-Aminosäure wählten wir den Z-geschützten Dipeptidester Z-TFM-Ala-(S)-Pro-OBn **10**.

Formelschema 6



Die beiden diastereomeren Dipeptide **10a/10b** lassen sich durch Flash-Chromatographie und anschließende fraktionierende Kristallisation problemlos trennen. **10a**, das in Form farbloser Kristalle gewonnen werden konnte, wurde einer Röntgenstruktur-Analyse unterworfen. Das Ergebnis der Untersuchung zeigt, daß das N-terminal an den (S)-Prolin-benzylester gebundene TFM-Alanin in der (S)-Konfiguration vorliegt (Abb. 1). Der diastereomere Dipeptidester **10b** besitzt demnach die Konfiguration (R, S).

Details zur Strukturlösung und Verfeinerung sind in den Tabellen 5 und 6 zusammengefaßt. Weitere Einzelheiten zur Kristallstruktur-Untersuchung können beim

Tabelle 5 Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung der Verbindung **10a**

Formel	$C_{24}H_{25}N_2O_5F_3$
M_r	478,47
Kristallgröße [mm]	0,2 · 0,4 · 0,4
Kristallsystem	orthorhombisch
Raumgruppe	$P2_12_12_1$
a [Å]	8,363 (1)
b [Å]	12,677 (1)
c [Å]	21,642 (4)
α [Å]	90
β [°]	90
γ [Å]	90
V [Å ³]	2294,44
$\rho_{\text{ber.}}$ [gcm ⁻³]	1,385
Z	4
F (000) [e]	1000
μ (Mo - K_{α}) [cm ⁻¹]	1,064
T [°C]	- 50
Diffraktometer	Enraf Nonius CAD4
Strahlung	Mo - K_{α}
λ (Mo - K_{α}) [Å]	0,71069
Scan	ω
Scanbreite [°, in ω]	0,8
hkl Bereich	$\pm 9, + 14, + 25$
$\sin(\theta/\lambda)_{\text{max}}$ [Å ⁻¹]	0,59
gemessene Reflexe	4344
unabhängige Reflexe	2299
R_{int}	0,015
beobachtete Reflexe	2041
Absorptionskorrektur	-
$t_{\text{max}}/t_{\text{min}}$	-
$F_o \geq$	$4 \sigma (F_o)$
Verfeinerte Parameter	307
Strukturlösung	direkte Methoden
H Atome (gef./ber.)	25/0 ^{b)}
R^a)	0,0346 ^{c)}
R_w^b)	0,0339 ^{c)}
(shift/error) _{max}	0,001
ρ_{fin} (max/min) [e Å ⁻³]	+ 0,37 / - 0,37

^{a)} $R = \Sigma(|F_o| - |F_c|) / \Sigma|F_o|$; ^{b)} $R_w = [\Sigma w(|F_o| - |F_c|)^2 / \Sigma w F_o^2]^{1/2}$, $w = 1/\sigma^2(F_o)$.

^{b)} Alle H-Atome wurden konstant ($U_{\text{iso}} = 0,05 \text{ \AA}^2$) in die Strukturfaktorenberechnung mit einbezogen.

^{c)} Die Verfeinerung des inversen Modells (D,D-Form) lieferte identische R-Werte

Fachinformationszentrum Karlsruhe, Gesellschaft für wissenschaftlich-technische Information mbH, D-7514 Eggenstein-Leopoldshafen 2, unter Angabe der Hinterlegungsnummer CSD-56532, der Autoren und des Zeitschriftenzitats angefordert werden.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für die finanzielle Förderung dieser Untersuchungen. Die Firma Hoechst AG, Frankfurt/Main, unterstützte dieses Projekt dankenswerterweise durch großzügige Chemikalien-Spenden. Frau Schaaf, Universität Leipzig, sei für wertvolle experimentelle Mitarbeit gedankt.

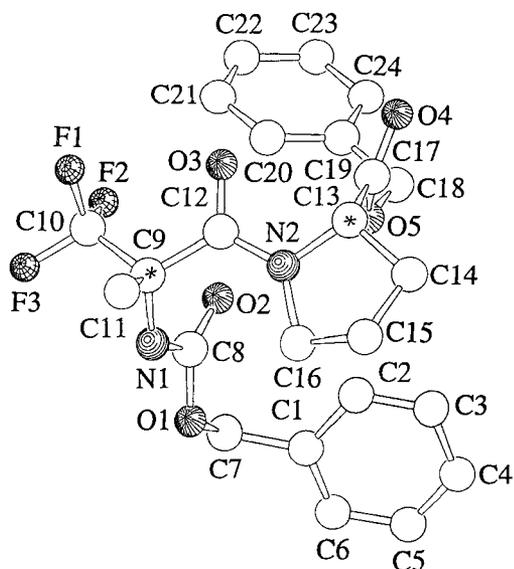


Abb.1 Molekülstruktur des Diastereomeren 10a mit Atomnummerierung.

Beschreibung der Versuche

Schmelzpunkte (unkorrigiert): Apparatur nach Tottoli (Fa. Büchi). – IR-Spektren: Perkin Elmer Geräte 157 G bzw. 257. – $^1\text{H-NMR}$: Bruker AC 250 (250,1 MHz) bzw. Bruker AM 360 (360,1 MHz), Tetramethylsilan als interner Standard. – $^{13}\text{C-NMR}$: Bruker AM 360 (90,6 MHz), Tetramethylsilan als interner Standard. – $^{19}\text{F-NMR}$: Jeol C 60 HL (56,5 MHz) bzw. Bruker AC 250 (235,3 MHz), Trifluoressigsäure als externer Standard. – Elementaranalysen: C,H,N-Analysenautomat EA 415/0, Monar System (Fa. Heraeus). – Drehwerte: Perkin Elmer 241 MC Polarimeter. – Flash-Chromatographie: Kieselgel S (Riedel de Haen), Korngröße 30–63 μm . – Säulenchromatographie: Kieselgel 60 (Riedel de Haen), Korngröße 63–200 μm .

Enzymatische Hydrolyse (Tab. 1)

Die Hydrolysestudien wurden unter pH-Stat-Bedingungen mit Hilfe eines Video-Titrators VII (Radiometer, Copenhagen) durchgeführt. Das Gesamtvolumen (2 ml) eines jeden Versuchs bestand aus:

Tabelle 6 Fraktionelle Atomkoordinaten und äquivalente Auslenkungsparameter für Verbindung 10a. [$U_{(\text{eq})} = (U_1 \cdot U_2 \cdot U_3)^{1/3}$, U_1, U_2, U_3 sind die Eigenwerte der $U_{(ij)}$ -Matrix; Standardabweichungen in Klammern].

Atom	X/A	Y/B	Z/C	U(eq.)
C 1	0,2106 (3)	0,1411 (2)	0,5879 (1)	0,042
C 2	0,0921 (3)	0,2143 (2)	0,5741 (1)	0,058
C 3	-0,0182 (3)	0,1945 (3)	0,5278 (1)	0,070
C 4	-0,0107 (4)	0,1011 (3)	0,4948 (1)	0,070
C 5	0,1044 (5)	0,0292 (3)	0,5088 (1)	0,065
C 6	0,2147 (4)	0,0479 (2)	0,5550 (1)	0,056
C 7	0,3388 (3)	0,1639 (2)	0,6348 (1)	0,045
O 1	0,2768 (2)	0,1793 (1)	0,69757 (6)	0,041
C 8	0,2434 (2)	0,2804 (2)	0,71219 (9)	0,033
O 2	0,2522 (2)	0,3540 (1)	0,67712 (6)	0,038
N 1	0,1971 (2)	0,2867 (1)	0,77262 (7)	0,033
C 9	0,1395 (3)	0,3847 (2)	0,79962 (9)	0,034
C 10	0,2846 (3)	0,4551 (2)	0,8159 (1)	0,042
F 1	0,2452 (2)	0,5374 (1)	0,85142 (6)	0,053
F 2	0,3658 (1)	0,4924 (1)	0,76767 (6)	0,047
F 3	0,3915 (2)	0,3986 (1)	0,84920 (7)	0,057
C 11	0,0536 (3)	0,3592 (2)	0,8607 (1)	0,045
C 12	0,0250 (3)	0,4474 (2)	0,75749 (9)	0,031
O 3	0,0409 (2)	0,5429 (1)	0,75186 (7)	0,037
C 13	-0,2148 (2)	0,4616 (2)	0,6968 (1)	0,035
N 2	-0,0986 (2)	0,3965 (1)	0,73046 (8)	0,031
C 14	-0,3374 (3)	0,3816 (2)	0,6725 (1)	0,043
C 15	-0,3242 (3)	0,2904 (2)	0,7187 (1)	0,045
C 16	-0,1454 (3)	0,2840 (2)	0,7306 (1)	0,039
C 17	-0,1424 (2)	0,5250 (2)	0,6450 (1)	0,034
O 4	-0,1801 (2)	0,6146 (1)	0,63233 (7)	0,042
O 5	-0,0408 (2)	0,4675 (1)	0,61144 (6)	0,039
C 18	0,0242 (3)	0,5165 (2)	0,5566 (1)	0,045
C 19	0,1662 (3)	0,5855 (2)	0,56852 (9)	0,033
C 20	0,2486 (3)	0,5864 (2)	0,62397 (9)	0,041
C 21	0,3838 (3)	0,6477 (2)	0,6311 (1)	0,045
C 22	0,4402 (3)	0,7075 (2)	0,5833 (1)	0,051
C 23	0,3583 (4)	0,7085 (2)	0,5279 (1)	0,059
C 24	0,2220 (3)	0,6472 (2)	0,5203 (1)	0,047

20 % (v/v) DMF, 1 % (v/v) Phosphatpuffer (0,02 M; pH 6), 10–200 µl Enzymlösung, 10–50 µl Substratlösung, mit 0,2 M NaCl-Lösung auf 2 ml auffüllen.

Zur Durchführung der Messungen wurden DMF, Puffer, NaCl-Lösung und Enzymlösung gemischt, auf 30 °C thermostatisiert und durch Zugabe der Substratlösung die Hydrolyse gestartet.

- Stammlösung der Substrate: 0,12 mmol/ml DMF;
- Stammlösung der Enzyme: 5 mg Subtilisin/ml Wasser; 10 mg α-Chymotrypsin/ml Wasser; 20 mg Papain/ml DTT-Lösung (0,97 µmol DDT/ml Wasser)

Alkalische Hydrolyse (Tab. 2)

Apparative Durchführung und Stammlösung der Substrate wie voranstehend beschrieben. Das Gesamtvolumen eines jeden Ansatzes bestand aus:

20 % (v/v) DMF, 10 % (v/v) Phosphatpuffer (0,02 M; pH 6), 20 µl Substratlösung, mit dest. Wasser auf 2 ml auffüllen.

Zur Durchführung der Messungen wurden DMF, Puffer und Wasser gemischt, auf 30 °C thermostatisiert, mit Argon gespült, der pH auf 9 eingestellt und durch Substratzugabe die Reaktion gestartet.

N-(2-Trifluormethylphenylglycyl)-L-phenylalanin-methylester (5)

Darstellung aus 613 mg (2,5 mmol) NCA-D,L-TFM-Phg (4) und 896 mg (5 mmol) L-Phe-OME [2]. Zeigt die ¹⁹F-NMR-Analyse kein Edukt mehr an, wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand chromatographisch gereinigt (Säulenmaterial: Kieselgel 60, Eluent: Essigester). Ausbeute 625 mg Dipeptidester 5 [88 %-ig (HPLC-Analyse), 58 % d. Th.]; nach Umkristallisation aus Ether/Hexan 270 mg weiße Kristalle mit Fp. 98–99 °C. Aus der Mutterlauge werden weitere 355 mg Dipeptidester als Öl erhalten. Beide Fraktionen sind im MS identisch. MS (FAB): 381 (M + 1), 364 (M – NH₂), 321 (M – CO₂CH₃), 174 (C₈H₇F₃N).

Enzymatische Synthese von N-[N'-(2-Trifluormethylphenylglycyl)-L-phenylalanyl]-L-leucinamid (6)

37 mg (0,1 mmol) H-TFM-Phg-Phe-OME (5) werden in 0,5 ml DMF gelöst und zu 65 mg (0,5 mmol) L-H-Leu-NH₂ in 0,5 ml Carbonatpuffer (0,2 M, pH 8,8) gegeben. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2,5 mg α-Chymotrypsin gestartet. Nach 30 min Rühren bei 25 °C beträgt die analytische Ausbeute 86 % d. Th. an 6.

2-Benzyl-4-trifluormethyl-5(4H)-oxazolone (7) durch Umsetzung von Z-TFM-Aminosäuren (2) mit Chlorameisensäure-ethylester/Triethylamin (Methode A)

Allgemeine Arbeitsvorschrift: Die Lösung von 5 mmol einer N-Benzyl-oxycarbonyl-α-trifluormethyl-α-aminosäure 2 [18] und 0,55 g (5 mmol) Chlorameisensäureethylester in 25 ml wasserfreiem Methylenchlorid wird bei Raumtemperatur unter Rühren mit 0,51 g (5 mmol) Triethylamin versetzt. Die Bildung des 4-Trifluormethyl-5(4H)-oxazolons 7 kann ¹⁹F-NMR-spektroskopisch verfolgt werden. Sie ist in Minutenfrist abgeschlossen. Die Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie (Eluent: Chloroform).

2-Benzyl-4-trifluormethyl-5(4H)-oxazolone (7) durch Umsetzung von 2 mit Dicyclohexylcarbodiimid (Methode B) Allgemeine Arbeitsvorschrift: 5 mmol 2 werden in 25 ml Methylenchlorid gelöst und mit 1,13 g (5,5 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid umgesetzt. Man rührt solange bei Raumtemperatur, bis die ¹⁹F-NMR-Analyse vollständigen Umsatz anzeigt. Nach Abtrennen des ausgefallenen Harnstoffs wird wie oben gereinigt.

2-Benzyl-4-trifluormethyl-5(4H)-oxazolone (7) durch Umsetzung von 2 mit Chlorphosphorsäurediphenylester/Triethylamin (Methode C)

Allgemeine Arbeitsvorschrift: 5 mmol 2 und 1,34 g (5 mmol) Chlorphosphorsäure-diphenylester werden in 20 ml Methylenchlorid gelöst. Anschließend werden innerhalb von 20 min 1,06 g (10,5 mmol) Triethylamin in 5 ml Methylenchlorid zugetropft. Man rührt bei Raumtemperatur bis die ¹⁹F-NMR-Analyse vollständigen Umsatz anzeigt, trennt vom ausgefallenen Salz ab und reinigt wie oben beschrieben.

2-Benzyl-4-methyl-4-trifluormethyl-5(4H)-oxazolone (7a)

Reinigung durch Säulenchromatographie (Eluent: Chloroform) und anschließende Destillation im Kugelrohrfen, Kp. 105 °C/0,9 Torr; Ausbeute 75 % 7a (Methode A); IR (Film): ν = 1840, 1675 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1,66 (s; 3 H, CH₃), 5,38–5,45 (m; 2 H, OCH₂), 7,38–7,45 ppm (m; 5 Aromaten-H). – ¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 18,34 (q; J = 1,0 Hz, CH₃), 71,94 (q; J = 29,9 Hz, C-CF₃), 72,99 (OCH₂), 122,87 (q; J = 283,1 Hz, CF₃), 128,83, 129,38, 133,33 (Aromaten-C), 160,31 (C=N), 170,19 ppm (C=O). – ¹⁹F-NMR (CDCl₃): δ = 0,26 ppm (s; CF₃).

C ₁₂ H ₁₀ F ₃ NO ₃	Ber.:	C 52,76	H 3,69	N 5,13
(273,2)	Gef.:	C 52,42	H 3,99	N 5,26

2-Benzyl-4-isobutyl-4-trifluormethyl-5(4H)-oxazolone (7b)

Reinigung durch Säulenchromatographie (Eluent: Chloroform/Hexan, 1 : 1), Fp. 35–36 °C; Ausbeute 80 % 7b (Methode B), Ausbeute 70 % 7b (Methode C); IR (Film): ν = 1845, 1670 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0,82 (d; J = 6,6 Hz, 3 H, CH₃), 0,91 (d; J = 6,7 Hz, 3 H, CH₃), 1,51–1,62 (m; 1 H, CH), 1,94 (dd; J = 7,7 Hz, J = 14,1 Hz, 1 H CH₂), 2,06 (dd; J = 5,3 Hz, J = 14,1 Hz, 1 H, CH₂), 5,45 (s; 2 H, OCH₂), 7,36–7,46 ppm (m; 5 Aromaten-H). – ¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 22,55, 23,85, 23,93 [2 × CH₃, CH(CH₃)₂], 38,76 (CH₂), 72,86 (OCH₂), 75,31 (q; J = 28,2 Hz, C-CF₃), 122,89 (q; J = 284,2 Hz, CF₃), 128,70, 128,76, 129,29, 133,45 (Aromaten-C), 160,18 (C=N), 170,61 ppm (C=O). – ¹⁹F-NMR (CDCl₃): δ = 1,01 ppm (s; CF₃).

C ₁₅ H ₁₆ F ₃ NO ₃	Ber.:	C 57,14	H 5,12	N 4,44
(315,3)	Gef.:	C 57,17	H 5,11	N 4,56

2-Benzyl-4-benzyl-4-trifluormethyl-5(4H)-oxazolone (7c)

Reinigung durch Säulenchromatographie (Eluent: Chloroform/Hexan, 1 : 1), farbloses Öl; Ausbeute 88 % 7c (Methode B), 85 % 7c (Methode C); IR (Film): ν = 1835, 1675 cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 3,27 (d; J = 13,3 Hz, 1 H, CH₂), 3,39 (d; J = 13,3 Hz, 1 H, CH₂), 5,31–5,39 (m; 2 H, OCH₂),

7,06–7,08 (m; 2 Aromaten-H), 7,16–7,27 (m; 3 Aromaten-H), 7,32–7,41 ppm (m; 5 Aromaten-H). – $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 36,78$ (CH_2), $72,73$ (OCH_2), $76,65$ (q; $J = 28,3$ Hz, C- CF_3), $122,66$ (q; $J = 283,7$ Hz, CF_3), $127,96$, $128,45$, $128,68$, $129,18$, $130,41$, $131,21$, $133,34$ (Aromaten-C), $160,08$ (C=N), $169,00$ ppm (C=O). – $^{19}\text{F-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 2,04$ ppm (s; CF_3).

$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{NO}_3$ Ber.: C 61,89 H 4,04 N 4,01
(349,3) Gef.: C 61,95 H 3,96 N 3,98

2-Benzoyloxy-4-phenyl-4-trifluormethyl-5(4H)-oxazolone (7d)

Reinigung durch Säulenchromatographie (Eluent: Chloroform), farbloses Öl; Ausbeute 88 % **7d** (Methode B), Ausbeute 76 % **7d** (Methode C); IR (Film): $\nu = 1835$, 1675 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 5,50$ – $5,57$ (m; 2H, OCH_2), $7,37$ – $7,48$ (m; 8 Aromaten-H), $7,79$ – $7,82$ (m; 2 Aromaten-H). – $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 73,20$ (OCH_2), $75,83$ (q; $J = 30,1$ Hz, C- CF_3), $122,17$ (q; $J = 284,1$ Hz, CF_3), $128,70$, $128,82$, $128,89$, $129,38$, $130,01$, $130,05$, $133,35$ (Aromaten-C), $127,34$ (q; $J = 0,6$ Hz, Aromaten-C), $160,25$ (C=N), $168,50$ ppm (C=O). – $^{19}\text{F-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 2,39$ ppm (s; CF_3).

$\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{NO}_3$ Ber.: C 60,90 H 3,61 N 4,18
(335,3) Gef.: C 61,05 H 3,66 N 4,20

Peptidsynthesen mit 2-Benzoyloxy-4-trifluormethyl-5(4H)-oxazolonen (8)

Allgemeine Vorschrift: 5 mmol **7** werden in 25 ml Methylchlorid mit 5 mmol des entsprechenden L-Aminosäureester-Hydrochlorids und 0,51 g (5 mmol) Triethylamin (bzw. 5 mmol L-Aminosäureester) 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Reaktionslösung zweimal mit Wasser gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung der Produkte erfolgt durch Flash-Chromatographie.

Es ist nicht notwendig, die voranstehend beschriebenen 4-Trifluormethyl-5(4H)-oxazolone **7** in isolierter Form einzusetzen. Vielmehr kann man die Methoden A–C direkt mit der oben aufgeführten Reaktion kombinieren und damit die Dipeptidsynthese als „Eintopfreaktion“ durchführen. Die Ausbeuten der Eintopfreaktion sind nur unwesentlich geringer (Daten der Verbindungen **8** siehe Tab. 7–8).

***N*-[*N'*-(*N''*-Benzoyloxycarbonyl-2-trifluormethylalanyl)glycyl]-*L*-phenylalanin-benzylester (9)**

Diastereomeregemisch (Verhältnis 1:1); Reinigung und Trennung der Diastereomeren durch Flash-Chromatographie (Eluent: Essigester/Hexan, 2:1), Ausbeute 55 %; IR (KBr): $\nu = 3380$ – 3320 , 1730 – 1720 , 1680 – 1655 cm^{-1} .

Diastereomer 1: Fp. 145 – 146 °C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1,76$ (s; 3H, CH_3), $3,05$ (dd; $J = 7,6$ Hz, $J = 13,8$ Hz, 1H,

Tabelle 7 Physikalische und analytische Daten der Verbindungen **8a**–**8l**

		Summenformel	Molmasse	Ausb. (%) (Diast.-verh.)	Fp. [°C]	Elementaranalyse		
						C	H	N
8a	Z-TFM-Ala-Gly-OMe	$\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$	362,3	88	74–76	Ber. 49,72 Gef. 49,45	4,73 4,78	7,73 7,93
8b	Z-TFM-Ala-L-Val-OMe	$\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$	404,4	50 (1:1)	80–82 ^D	Ber. 53,46 Gef. 53,45	5,73 5,52	6,93 6,95
8c	Z-TFM-Leu-Gly-OMe	$\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$	404,4	55	Öl	Ber. 53,46 Gef. 53,42	5,73 5,71	6,93 7,05
8d	Z-TFM-Leu-L-Ala-OtBu	$\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$	460,5	67 (1:1)	75–78 ^D	Ber. 57,38 Gef. 57,49	6,79 7,02	6,08 6,15
8e	Z-TFM-Leu-L-Phe-OtBu	$\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$	536,6	61 (1:1)	68–74 ^D	Ber. 62,67 Gef. 62,73	6,57 6,62	5,22 5,20
8f	Z-TFM-Phe-Gly-OMe	$\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$	438,4	91	95	Ber. 57,53 Gef. 57,63	4,83 4,96	6,39 6,33
8g	Z-TFM-Phe-L-Ala-OtBu	$\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$	494,5	78 (1:1)	115–118 ^D	Ber. 60,72 Gef. 60,47	5,91 6,04	5,66 5,98
8h	Z-TFM-Phe-L-Leu-OMe	$\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$	494,5	59 (1:1)	96–105 ^D	Ber. 60,72 Gef. 60,63	5,91 5,94	5,66 5,76
8i	Z-TFM-Phe-L-Met-OMe	$\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$	512,5	37 (1:1)	Öl	Ber. 56,24 Gef. 56,39	5,31 4,94	5,46 5,40
8j	Z-TFM-Phe-L-Phe-OtBu	$\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$	570,6	54 (1:1)	98–105 ^D	Ber. 65,25 Gef. 65,16	5,83 6,10	4,91 4,90
8k	Z-TFM-Phg-L-Ala-OtBu	$\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$	480,5	71 (1:1)	110–120 ^D	Ber. 59,99 Gef. 59,89	5,66 5,73	5,83 5,83
8l	Z-TFM-Phg-L-Leu-OMe	$\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$	480,5	57 (1:1)	98–105 ^D	Ber. 59,99 Gef. 59,85	5,66 5,66	5,83 5,87

^D = Diastereomeregemisch

Phe-CH₂), 3,13 (dd; J = 6,2 Hz, J = 13,8 Hz, Phe-CH₂), 3,67 (dd; J = 5,0 Hz, J = 17,1 Hz, 1 H, Gly-CH₂), 3,75 – 4,11 (m; 1 H, Gly-CH₂), 4,81 – 4,92 (m; 1 H, NHCH), 5,02 (d; J = 12,3 Hz, 1 H, OCH₂), 5,04 (d; J = 12,0 Hz, 1 H, OCH₂), 5,08 (d; J = 12,3 Hz, 1 H, OCH₂), 5,10 (d; J = 12,0 Hz, 1 H, OCH₂), 6,11 (s; 1 H, Urethan-NH), 7,08 – 7,36 ppm (m;

17 H, 2 × Amid-NH, 15 Aromaten-H). – ¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 17,42 (CH₃), 37,69 (Phe-CH₂), 43,34 (Gly-CH₂), 53,77 (NHCH), 62,95 (q; J = 28,0 Hz, C-CF₃), 67,11, 67,83 (2 × OCH₂), 124,20 (q; J = 285,0 Hz, CF₃), 126,97, 127,12, 128,29, 128,39, 128,53, 128,64, 129,27, 134,97, 135,14, 135,40, 135,50, 135,94 (Aromaten-C), 155,08 (C =

Tabelle 8 ¹³C-NMR (360 MHz, CDCl₃) und ¹⁹F-NMR (250 MHz, CDCl₃) – Daten für **8a** – **8l** (δ-Werte in ppm, J in Hz)

	CF ₃ C	R ¹	¹³ C-NMR CF ₃	R ² C	R ²	Urethan Amid bzw. Ester	¹⁹ F-NMR (s)
8a	62,40 (q, J = 28,2)	17,30	124,19 (q, J = 285,8)	41,60	a)	154,28; 166,16; 169,58	1,65
8b/1	62,44 (q, J = 28,4)	17,33	124,36 (q, J = 286,1)	57,77	17,01; 18,71; 31,36	154,11; 165,37; 171,71	1,57
8b/2	62,81 (q, J = 28,5)	17,48	124,35 (q, J = 285,6)	57,72	17,06; 18,84; 31,53	154,19; 165,48; 171,74	1,61
8c	65,00 (q, J = 28,0)	22,58; 23,18; 24,03; 36,03	124,60 (q, J = 288,0)	42,02	a)	153,99; 165,77; 169,31	3,24
8d/1	64,79 (q, J = 27,8)	22,36; 23,32; 23,99; 35,95	124,69 (q, J = 288,1)	49,63	18,14	153,90; 164,51; 171,26	2,92
8d/2	64,79 (q, J = 27,8)	22,68; 23,32; 24,14; 36,25	124,69 (q, J = 288,1)	50,00	17,96	153,90; 164,79; 171,04	3,17
8e/1	64,77 (q, J = 27,9)	22,20; 23,29; 23,92; 35,95	124,56 (q, J = 288,1)	54,55	38,01; ^{b)}	153,84; 164,71; 169,60	3,29
8e/2	64,97 (q, J = 27,6)	22,68; 22,71; 24,06; 35,67	124,69 (q, J = 287,8)	55,09	37,73; ^{b)}	153,90; 165,22; 169,63	3,41
8f	66,05 (q, J = 27,4)	33,95; ^{b)}	124,35 (q, J = 287,9)	41,96	a)	154,39; 164,86; 169,41	5,35
8g/1/2	65,77/65,97 (q, J = 27,5)	33,74; ^{b)}	124,48 (q, J = 288,1)	49,63/ 49,94	17,92/ 18,13	154,24/154,30; 163,28/163,48; 171,16/171,45	5,06
8h/1	66,00 (q, J = 27,4)	33,77; ^{b)}	124,46 (q, J = 288,1)	51,74	21,80; 22,71; 24,57; 41,62	154,24; 163,90; 172,55	5,24
8h/2	65,85 (q, J = 27,3)	33,67; ^{b)}	124,31 (q, J = 287,9)	51,86	21,74; 22,66; 24,60; 41,51	154,22; 164,35; 172,43	5,08
8i/1	66,04 (q, J = 27,1)	33,79; ^{b)}	124,32 (q, J = 288,3)	52,39	15,28; 29,40; 31,01	154,23; 163,98; 171,54	5,30
8i/2	65,85 (q, J = 27,3)	33,79; ^{b)}	124,21 (q, J = 288,2)	52,66	15,27; 29,67; 31,11	154,17; 164,36; 171,38	5,13
8j/1/2	65,83 (q, J = 27,3)/ 65,94 (q, J = 27,5)	33,58/34,03 ^{b)}	124,40 (q, J = 288,2)	54,53/ 55,16	37,98; ^{b)}	154,17/154,23; 163,35/164,16; 169,60/169,81	5,39
8k/1	67,83 (q, J = 28,2)	^{b)}	124,07 (q, J = 288,0)	49,90	17,75	153,37; 164,70; 170,47	8,29
8k/2	67,72 (q, J = 28,1)	^{b)}	124,07 (q, J = 288,0)	49,90	17,67	153,57; 164,70; 170,63	8,38
8l/1/2	67,83 (q, J = 28,0)/ 68,01 (q, J = 27,9)	^{b)}	123,87 (q, J = 287,6)/ 123,99 (q, J = 287,7)	51,74/ 51,77	21,35/21,56; 22,55/22,67; 24,62/24,64; 40,64	153,60/153,69; 165,30/165,39; 171,90	7,91/ 8,08

a) R² = H

b) Die Signale der Phenyl-C-Atome sind wegen des Vorhandenseins der OCH₂C₆H₅-Gruppe nicht eindeutig zuzuordnen.

O, Urethan), 165,78, 168,43, 171,57 ppm ($3 \times C=O$, $2 \times$ Amid, Ester). – ^{19}F -NMR (CDCl_3): $\delta = 1,55$ ppm (s; CF_3). – $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = +29$ (c 1,0 in CHCl_3).

Diastereomer 2: Fp. 118 °C. – ^1H -NMR (CDCl_3): $\delta = 1,70$ (s; 3 H, CH_3), 3,04 (dd; $J = 7,4$ Hz, $J = 13,8$ Hz, 1 H, Phe- CH_2), 3,12 (dd; $J = 6,1$ Hz, $J = 13,8$ Hz, 1 H, Phe- CH_2), 3,79 (dd; $J = 5,1$ Hz, $J = 17,1$ Hz, 1 H, Gly- CH_2), 3,97 (dd; $J = 5,7$ Hz, $J = 17,1$ Hz, 1 H, Gly- CH_2), 4,78–4,84 (m; 1 H, NHCH), 5,01–5,10 (m; 4 H, $2 \times \text{OCH}_2$), 6,06 (s; 1 H, Urethan-NH), 7,05–7,07 (m; 2 H, $2 \times$ Amid-NH), 7,17–7,33 ppm (m; 15 Aromaten-H). – ^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 18,44$ (CH_3), 37,59 (Phe- CH_2), 43,23 (Gly- CH_2), 53,83 (NHCH), 62,40 (q; $J = 28,4$ Hz, C- CF_3), 67,17, 67,68 ($2 \times \text{OCH}_2$), 124,35 (q; $J = 286,8$ Hz, CF_3), 127,02, 128,26, 128,32, 128,42, 128,50, 128,55, 128,64, 129,23, 135,07, 135,40, 135,85 (Aromaten-C), 154,82 (C=O, Urethan), 166,27, 168,39, 171,40 ppm ($3 \times C=O$, $2 \times$ Amid, Ester). – ^{19}F -NMR (CDCl_3): $\delta = 2,28$ ppm (s; CF_3). – $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = -45$ (c 1,0 in CHCl_3)

$\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_6$ Ber.: C 61,53 H 5,16 N 7,18
(585,6) Gef.: C 61,53 H 5,15 N 7,23

N-(*N'*-Benzyloxycarbonyl-(*S*)-2-trifluormethylalanyl)-(*S*)-prolin-benzylester (**10a**)/*N*-(*N'*-Benzyloxycarbonyl-(*R*)-2-trifluormethylalanyl)-(*S*)-prolin-benzylester (**10b**)

1,37 g (5 mmol) 2-Benzyloxy-4-methyl-4-trifluormethyl-5(4H)-oxazolone (**7a**) werden in 25 ml Methylenchlorid mit 1,21 g (5 mmol) L-Prolinbenzylester-Hydrochlorid und 0,51 g (5 mmol) Triethylamin 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Reaktionslösung zweimal mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung und Trennung des Diastereomergemisches **10a**/**10b** erfolgt durch Flash-Chromatographie (Eluent: Essigester/Hexan, 1:2); Ausbeute 55 %; IR (KBr): $\nu = 3340$, 1735, 1725, 1645 cm^{-1} .

10a (Diastereomer 1): Ausbeute 70 mg (15 %) mit Fp. 88–89 °C; ^1H -NMR (CDCl_3): $\delta = 1,72$ –1,90 (m; 4 H, Pro- H_{β} , Pro- H_{γ}), 1,84 (s; 3 H, CH_3), 3,40 (m; 1 H, Pro- H_{δ}), 3,71–3,77 (m; 1 H, Pro- H_{δ}), 4,56–4,68 (m; 1 H, Pro- H_{α}), 5,08–5,18 (m; 4 H, $2 \times \text{OCH}_2$), 5,66 (s; 1 H, Urethan-NH), 7,29–7,36 ppm (m; 10 Aromaten-H). – ^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 18,18$ (CH_3), 25,79 (Pro-C $_{\gamma}$), 27,66 (Pro-C $_{\beta}$), 48,09 (Pro-C $_{\delta}$), 61,74 (Pro-C $_{\alpha}$), 63,66 (q; $J = 27,4$ Hz, C- CF_3), 66,82 (OCH_2), 67,43 (OCH_2), 124,62 (q; $J = 285,8$ Hz, CF_3), 128,17, 128,51, 128,59, 135,72 (Aromaten-C), 154,05 (C=O, Urethan), 164,01, 171,54 ppm (C=O, Amid, Ester). – ^{19}F -NMR (CDCl_3): $\delta = 2,41$ ppm (s; CF_3). – $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = -67$ (c 1,0 in CHCl_3).

10b (Diastereomer 2): 100 mg (21 %) mit Fp. 160–162 °C; ^1H -NMR (CDCl_3): $\delta = 1,62$ –2,05 (m; 4 H, Pro- H_{β} , Pro- H_{γ}), 1,82 (s; 3 H, CH_3), 3,27–3,34 (m; 1 H, Pro- H_{δ}), 3,54–3,58 (m; 1 H, Pro- H_{δ}), 4,61 (m; 1 H, Pro- H_{α}), 5,00–5,23 (m; 4 H, $2 \times \text{OCH}_2$), 5,63 (s; 1 H, Urethan-NH), 7,28–7,39 ppm (m; 10 Aromaten-H). – ^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 17,75$ (CH_3), 25,57 (Pro-C $_{\gamma}$), 27,62 (Pro-C $_{\beta}$), 47,47 (Pro-C $_{\delta}$), 60,65 (Pro-C $_{\alpha}$), 62,25 (q; $J = 27,3$ Hz, C- CF_3), 66,79 (OCH_2), 67,46 (OCH_2), 124,77 (q; $J = 285,0$ Hz, CF_3), 128,15, 128,24, 128,52, 128,53, 135,68 (Aromaten-C), 154,05 (C=O, Urethan), 164,48, 171,80 ppm (C=O, Amid, Ester). – ^{19}F -NMR (CDCl_3): $\delta = 2,56$ ppm (s; CF_3). – $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = -81$ (c 1,0 in CHCl_3).

$\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$ Ber.: C 60,24 H 5,27 N 5,86
(478,4) Gef.: C 60,18 H 5,23 N 5,87

Literatur

- [1] 2-Trifluormethylsubstituierte Aminosäuren, 15. Mitteilung. – 14. Mitteilung: N. Sewald, K. Burger, Liebigs Ann. Chem. **1992**, 947
- [2] Ch. Schierlinger, K. Burger, Tetrahedron Lett. **1992**, 193
- [3] H.-D. Jakubke, in: „The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology“, S. Undenfriend, J. Meienhofer, Edit., Academic Press, New York, **1987**, S. 103
- [4] V. Kasche, in: „Proteolytic Enzymes – A Practical Approach“, R.J. Beynon, R.S. Bond, Edit., IRL Press, Oxford, **1989**, S. 125
- [5] H.-D. Jakubke, P. Kuhl, A. Könnecke, Angew. Chem. **97** (1985) 79; Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **24** (1985) 85
- [6] V.P. Kukhar', Yu.L. Yagupol'skii, V.A. Soloshonok, Usp. Khim. **59** (1990) 149; engl. Übers.: Russ. Chem. Rev. **59** (1990) 89
- [7] S.N. Osipov, N.D. Chkanikov, A.F. Kolomiets, A.V. Fokin, Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim. **1986**, 1384; engl. Übers.: Bull. Acad. Sci. USSR **1986**, 1256
- [8] K. Burger, K. Geith, K. Gaa, Angew. Chem. **100** (1988) 860; Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **27** (1988) 848
- [9] K. Burger, E. Höss, K. Gaa, N. Sewald, Ch. Schierlinger, Z. Naturforsch. **46b** (1991) 361 und dort zitierte Lit.
- [10] T. Wieland, H. Bernhard, Liebigs Ann. Chem. **571** (1951) 190
- [11] V. Schellenberger, H.-D. Jakubke, Angew. Chem. **103** (1991) 1440; Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **30** (1991) 1437
- [12] F. Weygand, W. Steglich, Chem. Ber. **98** (1965) 487
- [13] S.P. Kobzev, V.A. Soloshonok, S.V. Galushko, Yu.L. Yagupol'skii, V.P. Kukhar', Zh. Obshch. Khim. **59** (1989) 909; J. Gen. Chem. USSR **59** (1989) 801
- [14] K. Morihara, T. Oka, Biochem. J. **163** (1977) 531
- [15] F.M.F. Chen, Y. Lee, R. Steinhauer, N.L. Benoiton, Can. J. Chem. **65** (1987)
- [16] F.M.F. Chen, N.L. Benoiton, Can. J. Chem. **65** (1987) 619
- [17] W. Baker, W.D. Ollis, V.D. Poole, J. Chem. Soc. **1950**, 1542
- [18] K. Burger, K. Gaa, Chem.-Ztg. **114** (1990) 101

Korrespondenzanschriften:

Prof. Dr. K. Burger,
Organisch-Chemisches Institut der Technischen Universität
München,
Lichtenbergstraße 4,
W-8046 Garching, Bundesrepublik Deutschland

Prof. Dr. H.-D. Jakubke,
Fachbereich Biowissenschaften, Institut für Biochemie
der Universität,
Talstr. 33,
O-7010 Leipzig, Bundesrepublik Deutschland