

P. Pachaly

Die Darstellung von threo- und erythro-3-Aryl-glutaminsäuren

Aus dem Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn
(Eingegangen am 10. März 1971)

Aus cis-3-Aryl-2-äthoxycarbonyl-pyrrolidonen-(5) werden durch Hydrolyse threo-3-Aryl-glutaminsäuren erhalten, während entsprechend trans-3-Aryl-2-äthoxycarbonyl-pyrrolidone-(5) die erythro-3-Aryl-glutaminsäuren liefern.

Synthesis of threo- and erythro-3-Aryl-glutamic Acids.

Threo-3-aryl-glutamic acids are obtainable from cis-3-aryl-2-ethoxycarbonyl-5-pyrrolidones by hydrolysis, while the corresponding erythro-3-aryl-glutamic acids could be obtained from trans-3-aryl-2-ethoxycarbonyl-5-pyrrolidones in the same manner.

Unter den bisher synthetisierten Analoga von Aminosäuren gibt es einige, z.B. Äthionin, L-threo-Phenylserin, p-Fluor-phenylalanin, Azaserin, die als Antimetaboliten natürlicher Aminosäuren eine Hemmwirkung auf das Zellwachstum zeigen. Es lag nahe, solche Verbindungen für die Chemotherapie des Krebses oder der Viruserkrankungen einzusetzen, doch erwiesen sich alle geprüften Verbindungen für eine therapeutische Verwendung entweder als zu schwach wirksam oder als zu toxisch.

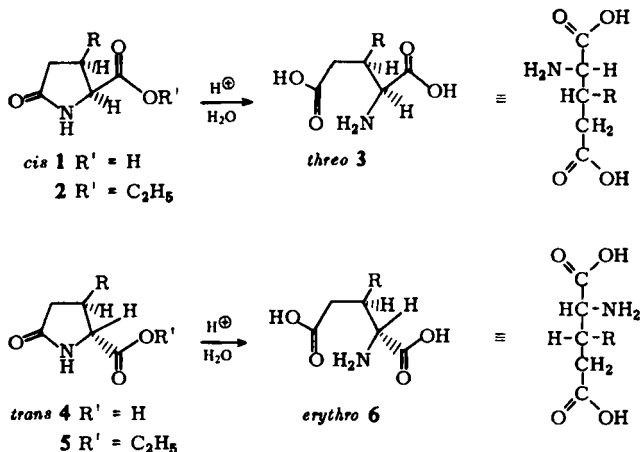
Auf der Suche nach wirksamen, weniger toxischen Aminosäureantagonisten erschien uns deshalb die Darstellung von 3-aryl-substituierten Glutaminsäuren interessant, da diese – bis auf Phenyl-glutaminsäure – unbekanntem Verbindungen möglicherweise die Wirkung sowohl der Glutaminsäure als auch des Phenylalanins im Zellstoffwechsel antagonistisch beeinflussen können.

Es zeigte sich, daß bei bereits geprüften¹⁾ N-acyl- oder C-alkyl-substituierten Glutaminsäuren nur eine der jeweils möglichen diastereomeren Formen biologisch wirksam ist²⁾.

Die übliche Synthese von 3-alkyl-substituierten Glutaminsäuren^{3,4,5)} führte allerdings immer zu Diastereomeren-gemischen, die sich auch chromatographisch nicht trennen ließen. Nachdem es uns kürzlich gelungen war, stereoselektiv sowohl cis- als

- 1 W. A. Zygmunt, R. L. Evans und H. E. Stavely, *Canad. J. mikrobiol.* 8, 869 (1962), *C. A.* 59, 3108c (1963)
- 2 H. M. Kagan und A. Meister, *Biochemistry* 5, 725 (1966)
- 3 D. C. Morrison, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 6072 (1955)
- 4 Y. C. Kim und G. H. Cocolas, *J. med. Chem.* 8, 509 (1965)
- 5 Hirooki Sasaki u. Fuki Takahashi, *Nippon Kagaku Zasshi* 77, 410 (1956), *C. A.* 52, 9016 (1958)

auch trans-3-Aryl-2-äthoxycarbonyl-pyrrolidone-(5)^{6,7)} zu gewinnen, besaßen wir die Ausgangsstoffe für eine selektive Hydrolyse zu den gewünschten threo- bzw. erythro-3-Aryl-glutaminsäuren 3 bzw. 6. Im Hinblick auf eine biologische Prüfung haben wir eine Reihe dieser Verbindungen hergestellt und ihre Eigenschaften untersucht.



| Verbindg. | R | Verbindg. | R |
|-----------|--|-----------|---|
| a | C ₆ H ₄ -OH(<i>p</i>) | e | Pyridyl-(3) |
| b | C ₆ H ₄ -OCH ₃ (<i>p</i>) | f | Pyridyl-(4) |
| c | C ₆ H ₄ -CH ₃ (<i>p</i>) | g | Pyridyl-(2) |
| d | C ₆ H ₅ | h | C ₆ H ₄ -NO ₂ (<i>m</i>) |

Zur Hydrolyse des Lactamringes werden die reinen cis- bzw. trans-3-Aryl-2-carboxypyrrolidone 1 bzw. 4 oder deren Äthylester 2 bzw. 5 mit Salzsäure unter Rückfluß erhitzt. Mit dieser bei Eiweißhydrolysen üblichen Methode werden Peptidbindungen vollständig gespalten, ohne die Aminosäuren zu einem größeren Prozentsatz zu racemisieren.

Obwohl es sich bei den cis- bzw. trans-Pyrrolidoncarbonsäuren 1 bzw. 4 oder den Äthylestern 2 bzw. 5 jeweils um Racemate handelt, muß bei der Hydrolyse die Konfigurationsänderung am C-2, die ja bei der Racemisierung einer optisch aktiven Aminosäure eintritt, vermieden werden. Die Epimerisierung am C-2 wurde nämlich aus der cis-Verbindung 1 die trans-Verbindung 4 bzw. aus der threo-Verbindung 3 die erythro-Form 6 entstehen lassen, es würde also letztlich das unerwünschte Diastereomeren-gemisch resultieren.

Durch die Herabsetzung der bei Peptiden üblichen Hydrolysezeit von 24 bis 36 Std. auf 12 Std. gelang es, die threo- und erythro-Aryl-glutaminsäuren 3 und 6 ohne meßbare Epimerisierungen zu gewinnen. Zur Reinigung und Abtrennung der Chloridionen

6 P. Pachaly, Chem. Ber. 104, 412 (1971)

7 P. Pachaly, Chem. Ber. 104, 429 (1971)

wird der Trockenrückstand des Hydrolysats über einen schwach basischen Anionenaustauscher gegeben und mit 0,5 n Essigsäure eluiert. Die Aryl-glutaminsäuren lassen sich mit der Ninhydrinprobe in den einzelnen Fraktionen leicht auffinden. Kontinuierlich und bequemer kann man die Elution konduktometrisch oder UV-spektroskopisch bei 280 nm verfolgen, da die Aryl-glutaminsäuren sich unter diesen Bedingungen sowohl durch eine Leitfähigkeitsminderung als auch durch eine starke Absorption zu erkennen geben. Andere Leitfähigkeitsänderungen und UV-Absorptionen im Elutionsdiagramm stammen von bräunlichen Zersetzungsprodukten und für den Fall der Pyridyl-(3) bzw. (4)-Verbindungen von geringen Mengen Pyrrolidincarbonsäuren **1e**, **f** bzw. **4e**, **f**. Eine quantitative Hydrolyse der Pyridyl-(3) bzw. -(4)-Verbindungen ließ sich weder durch Verdoppelung der Reaktionszeit noch durch erhöhte Säuremenge erzwingen. Bei allen anderen Verbindungen konnte kein Ausgangsstoff **1** oder **4** isoliert werden.

Die threo- und erythro-3-(*p*-Hydroxy-phenyl)-glutaminsäure **3a** und **6a** treten bei der Hydrolyse der *cis*- und *trans*-3-(*p*-Methoxy-phenyl)-Verbindung **1b** und **2b** bzw. **4b** und **5b** als Nebenprodukte auf und werden später als die threo- und erythro-3-(*p*-Methoxy-phenyl)-glutaminsäuren **3b** und **6b** vom Ionenaustauscher eluiert.

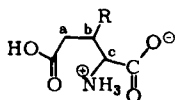
Schon nach wenigen Stunden kristallisieren **3a** und **6a** in der 0,5 n Essigsäure aus und zeigen damit ihre Verwandtschaft zum ebenfalls schwer löslichen Tyrosin. Genauso geben die *p*-Hydroxyphenyl-glutaminsäuren **3a** und **6a** die für Tyrosin charakteristische purpurrote Färbung mit α -Nitroso- β -naphthol⁸⁾.

Für die aus der *cis*-Verbindung **1h** erhaltenen threo-3-(*m*-Nitro-phenyl)-glutaminsäure (**3h**) kann die Ionenaustausch-Chromatographie unterbleiben, da diese Aminosäure so schwer löslich ist, daß sie in reiner Form bereits aus der stark salzsauren Lösung auskristallisiert. Alle threo- und erythro-Aryl-glutaminsäuren **3** und **6** geben die Ninhydrin-Reaktion und gehen beim Schmelzen unter Wasserabspaltung in die Pyrrolidincarbonsäuren **1** bzw. **4** über: Die Schmelze kristallisiert bei weiterem Erhitzen und schmilzt schließlich erneut mit dem Schmelzpunkt der entsprechenden Pyrrolidon-carbonsäure **1** bzw. **4**. In einigen Fällen kann diese Wasserabspaltung nur als Umwandlungspunkt von der einen in die andere Kristallform beobachtet werden, und man erhält als Schmelzpunkt den der korrespondierenden Pyrrolidon-carbonsäure. Erwartungsgemäß ergibt die Schmelze keine Farbreaktion mit Ninhydrin.

Alle Schmelzpunkte der threo-Verbindungen **3** liegen höher als die der erythro-Verbindungen **6**, sie entsprechen damit dem Schmelzverhalten der Pyrrolidon-carbonsäuren, wo analog die *cis*-Verbindungen einen höheren Schmelzpunkt zeigen^{6,7)}. Die Spektren der threo- und erythro-3-Aryl-glutaminsäuren **3** und **6** unterscheiden sich deutlich voneinander, bestätigen andererseits aber auch mit ihren typischen Merkmalen für Aminosäuren das Ergebnis der Elementaranalysen. Tab. 1 zeigt die NMR-Signallagen der wichtigsten Protonen von vier Aryl-glutaminsäurepaaren:

8 F. Feigl, Tüpfelanalyse, Akadem. Verlagsges., Frankfurt 1960, 4. Aufl. S. 404

Tabelle 1: H_1 -NMR-Signallagen einiger threo- und erythro-3-Aryl-glutaminsäuren **3** und **6**
 Lösungsmittel: CF_3COOH , $\tau = 10$, TMS als innerer Standard, m = Multiplett, s = Singulett



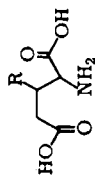
| Verbdg. | R | H ^a (m) | H ^b (m) | H ^c (m) | | (s) |
|-----------|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|------|
| 3b | C ₆ H ₄ OCH ₃ (p) | 6,69 | 6,00 | 5,28 | OCH ₃ | 6,00 |
| 3c | C ₆ H ₄ CH ₃ (p) | 6,71 | 6,00 | 5,31 | CH ₃ | 7,61 |
| 3d | C ₆ H ₅ | 6,67 | 5,94 | 5,21 | | |
| 3e | Pyridyl-(3) | 6,51 | 5,53 | 5,06 | | |
| 6b | C ₆ H ₄ OCH ₃ (p) | 6,66 | 6,00 | 5,07 | OCH ₃ | 6,00 |
| 6c | C ₆ H ₄ CH ₃ (p) | 6,66 | 6,02 | 5,07 | CH ₃ | 7,61 |
| 6d | C ₆ H ₅ | 6,62 | 6,00 | 5,08 | | |
| 6e | Pyridyl-(3) | 6,44 | 5,49 | 4,91 | | |

Die in Trifluor-essigsäure aufgenommenen Spektren ähneln sehr den Spektren verschiedener kern-substituierter Phenylalanine⁹). Besonders die Signale der Protonen H^b und H^c erscheinen genau wie dort durch die Wechselwirkung mit der benachbarten NH₃⁺-Gruppe in der stark sauren Lösung sehr breit und wenig aufgelöst. Das Signal der NH₃⁺-Gruppe selbst liegt unter denen der aromatischen Protonen und gibt sich deutlich auch durch die Integration zu erkennen. Bei den threo-3-Aryl-glutaminsäuren **3** liegt das Multiplett des Protons H^c bei höherem Feld als bei den erythro-Verbindungen **6**. Ob die jeweils erhaltenen threo- und erythro-Aryl-glutaminsäuren noch geringe Mengen des durch Epimerisierung während der Hydrolyse entstandenen anderen Diastereomerenpaares enthalten, läßt sich aus den breiten Signalen nicht ablesen.

Die IR-Spektren der threo- und erythro-3-Aryl-glutaminsäuren **3** und **6** zeigen die für Aminosäuren typischen Absorptionsbanden. Obwohl sich in den Spektren die threo-Verbindungen **3** in jedem Fall deutlich von den erythro-Verbindungen **6** unterscheiden, gibt es keine verwertbaren Absorptionsbanden, die man als charakteristisch für alle threo- bzw. erythro-3-Aryl-glutaminsäuren ansehen kann. Alle Verbindungen geben auch im rohen ungereinigten Zustand typische IR-Spektren, so daß dadurch eine Epimerisierung während der Hydrolyse zu einem größeren Prozentsatz ausgeschlossen erscheint. Für die threo- und erythro-3-Tolyl-glutaminsäuren **3c** und **6c** wurde diese Möglichkeit genauer untersucht. Aus den IR-Spektren einer Testreihe authentischer Mischungen der Verbindungen **3c** und **6c** ergibt sich, daß die Rohprodukte maximal bis zu 5 % des anderen Diastereomerenpaares enthalten können. Da sich nur wenige, dicht beieinanderliegende Schlüsselbanden zur quantitativen Bestimmung heranziehen lassen, ist durch IR-Spektren der sichere Nachweis einer unter 5 % liegenden Verunreinigung durch das andere Diastereomerenpaar nicht möglich.

⁹ F. A. Bovey und G. V. D. Tiers, J. Amer. chem. Soc. *81*, 2870 (1959)

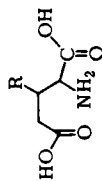
Tabelle 2: Analysendaten der threo-3-Aryl-glutaminsäuren 3a – h



| Vbdg. R | % Ausb. | Schmp.° | (umkrist. aus) | Ve (ml) | Summenformel | Ber./Gef. | |
|---|---------|----------------|-------------------------------|---------|--|--------------------------------|--|
| 3a ¹⁾ C ₆ H ₄ OH(p) | 25 | 248 z | (H ₂ O) | 440 | C ₁₁ H ₁₃ NO ₅ (239,1) | Ber.: C 55.23 Gef.: C 54,71 | H 5.48 H 5.34 N 5.66 |
| 3b C ₆ H ₄ OCH ₃ (p) | 60 | 188 – 196 u | (H ₂ O) | 340 | C ₁₂ H ₁₃ NO ₅ (253,1) | Ber.: C 56.91 Gef.: C 56.62 | H 5.97 H 6.04 N 5.97 |
| 3c C ₆ H ₄ CH ₃ (p) | 79 | 250 – 253 z | (H ₂ O) | 340 | C ₁₂ H ₁₃ NO ₄ · $\frac{1}{4}$ ·H ₂ O (241,6) | Ber.: C 59.70 Gef.: C 59.96 | H 6.47 H 6.31 N 5.76 |
| 3d C ₆ H ₅ | 94 | 197 – 201 z | (H ₂ O/ Aceton) | 350 | C ₁₁ H ₁₃ NO ₄ (223,1) | Ber.: C 59.20 Gef.: C 58.46 | H 5.87 H 5.78 N 6.40 |
| 3e Pyridyl-(3) | 86 | 230 – 232 | (H ₂ O) | 105 | C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₄ · $\frac{1}{4}$ ·H ₂ O (228,6) | Ber.: C 52.50 Gef.: C 52.44 | H 5.50 H 5.32 N 12.25 |
| 3f Pyridyl-(4) | 66 | 219 – 222 z | (H ₂ O/ Aceton) | 110 | C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₄ · $\frac{1}{4}$ ·H ₂ O (228,6) | Ber.: C 52.50 Gef.: C 52.35 | H 5.50 H 5.45 N 11.99 |
| 3g Pyridyl-(2) | 56 | 184 – 189 | (H ₂ O/ Aceton) | 165 | C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₄ · $\frac{1}{4}$ ·H ₂ O (228,6) | Ber.: C 52.50 Gef.: C 52.76 | H 5.50 H 5.65 N 12.14 |
| 3h C ₆ H ₄ NO ₂ (m) | 74 | 245 u 280 z | (H ₂ O) | 470 | C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₆ (268,1) | Ber.: C 49.25 Gef.: C 49.66 | H 4.51 H 4.59 N 10.45 N 10.46 |

1 3a wird als Nebenprodukt bei der Hydrolyse von 1b oder 2b erhalten; u = Umwandlung, z = Zersetzung

Tabelle 3: Analysendaten der erythro-3-Aryl-glutaminsäuren 6a – h



| Vbdg. R | % Ausb. | Schmp.° | (umkrist. aus) | Ve (ml) | Summenformel | Ber./Gef. |
|---|---------|--------------------------------|---------------------------------|---------|---|--------------------------------|
| 6a1) C ₆ H ₄ OH (p) | 20 | 234 – 238 z | (H ₂ O) | 400 | C ₁₁ H ₁₃ NO ₅ (239,1) | Ber.: C 55.23 Gef.: C 55.50 |
| 6b C ₆ H ₄ OCH ₃ (p) | 54 | 180 u 241 – 243 | (H ₂ O) | 300 | C ₁₂ H ₁₅ NO ₅ (253,1) | Ber.: C 56.91 Gef.: C 56.85 |
| 6c C ₆ H ₄ CH ₃ (p) | 40 | 167 – 169 z | (H ₂ O) | 320 | C ₁₂ H ₁₅ NO ₄ · $\frac{1}{4}$ H ₂ O (241,6) | Ber.: C 59.70 Gef.: C 59.97 |
| 6d C ₆ H ₅ | 83 | 186 – 188 z | (H ₂ O)/ Aceton) | 350 | C ₁₁ H ₁₃ NO ₄ (223,1) | Ber.: C 59.20 Gef.: C 59.31 |
| 6e Pyridyl-(3) | 67 | 189 – 191 z | (H ₂ O) | 125 | C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₄ (224,1) | Ber.: C 53.50 Gef.: C 53.44 |
| 6f Pyridyl-(4) | 60 | 202 – 203 z | (H ₂ O)/ Äthanol) | 110 | C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₄ · $\frac{1}{4}$ H ₂ O (228,6) | Ber.: C 52.50 Gef.: C 52.85 |
| 6g Pyridyl-(2) | 79 | 161 – 166 | (H ₂ O)/ Aceton) | 180 | C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₄ · $\frac{1}{4}$ H ₂ O (228,6) | Ber.: C 52.50 Gef.: C 52.90 |
| 6h C ₆ H ₄ NO ₂ (m) | 56 | 156 – 160 u 243 – 244 | (H ₂ O)/ Äthanol) | 440 | C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₆ · $\frac{1}{4}$ H ₂ O (272,6) | Ber.: C 48.40 Gef.: C 47.80 |

1 6a wird als Nebenprodukt bei der Hydrolyse von 4b oder 5b erhalten; u = Umwandlung, z = Zersetzung

Dieses Ergebnis wird durch Untersuchungen von Kamiya¹⁰⁾ bestätigt, der auf gleiche Weise optisch aktive cis- und trans-3-Hydroxy-pyrrolidon-carbonsäuren-2 ohne Verlust der optischen Aktivität zu den entsprechenden 3-Hydroxy-glutaminsäuren hydrolysierte.

Herrn Prof. Dr. F. Zymalkowski danke ich herzlich für die ständige Förderung, Fräulein I. Dreesen für sehr sorgfältige experimentelle Mitarbeit und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Gewährung einer Sachbeihilfe.

Beschreibung der Versuche

Analysen wurden von Frau Ilse Beetz, Mikroanalytisches Labor, Kronach, angefertigt. Schmp. wurden mit dem Schmp.-Mikroskop nach Opfer-Schaum gemessen und nicht korrigiert. IR-Spektren: Beckman IR 5a – Gerät, NMR-Spektren: Varian A 60A – Gerät. Ionenaustauschchromatographie: Fraktionensammler von LKB Ultrorac 7000, Uvicord Durchflußspektralphotometer II (280 nm), Leitfähigkeitsmeßgerät WTW LF 39.

Die IR-Spektren der Aryl-glutaminsäuren sollen in der DMS-Kartei (Verlag Chemie, Weinheim/Wutterworth Scientific Publications, London W. C. 2) erscheinen.

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der threo- und erythro-3-Aryl-glutaminsäuren 3 und 6.

1 mMol der reinen cis- bzw. trans-3-Aryl-pyrrolidon-5-carbonsäure-2 1 bzw. 4 oder deren Äthylester 2 bzw. 5 werden mit 50 ml 6 n HCl 12 Std. unter Rückfluß erhitzt. Danach wird die erhaltene Reaktionslösung filtriert, i. Vak. zur Trockne eingedampft, in wenig Wasser gelöst, auf eine mit 22 g Sephadex-Anionenaustauscher DEAE A25 beschickte Säule (2,5 · 30 cm) gegeben und mit 0,5 n Essigsäure unter Startbedingungen in 10-ml-Fractionen eluiert.

Die Elution der threo- bzw. erythro-3-Aryl-glutaminsäuren wird konduktometrisch und UV-spektroskopisch (280 nm) verfolgt und gibt sich durch Leitfähigkeitsminderung und starke Absorption zu erkennen. Da die Meßwerte durch Begleitstoffe ebenfalls variieren, muß das Eluat stichprobenartig mit Ninhydrinlösung geprüft werden. Durch vorsichtiges Einengen der ninhydrin-positiven Fractionen bei 40° i. Vak. erhält man die gewünschten reinen Aryl-glutaminsäuren 3 bzw. 6.

10 T. Kamiya, Chem. pharmac. Bull. (Tokyo) 17, 890 (1969)