

[Chem. Pharm. Bull.]  
23(11)2492-2495 (1975)

UDC 547.744.04 : 547.466.04 : 547.497.04

## Reaktionsmechanismus der Esterbildung aus N-Hydroxysuccinimid und Acylaminosäure mittels Dicyclohexylcarbodiimid\*

HIROSHI MORIMOTO, TAKEO KAWAKAMI, und NOBUYOSHI HAYASHI

*Isotope Research Laboratory, Takeda Chemical Industries, Ltd.<sup>1)</sup>*

(Eingegangen am 28. April 1975)

Es wurde Reaktionsmechanismus, nach welchem sich der Aktivester aus der Acylaminosäure und N-Hydroxysuccinimid mit Dicyclohexylcarbodiimid bildet, mit der  $^{18}\text{O}$  markierten Aminosäure untersucht.  $^{18}\text{O}$  befindet sich in der Carboxylgruppe des Aktivesters und in dem Dicyclohexylharnstoff. Durch Abspaltung des Hydroxyls der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid wird der Carboxyl-Kohlenstoff aktiviert und bildet mit N-Hydroxysuccinimid den Aktivester.

Eine der wichtigen Methoden der Peptidsynthese ist die Aminolyse der aktivierten Ester. Seitdem Wieland und Mitarbb.<sup>2)</sup> den Thioester angewandt haben, wurde über zahlreiche aktivierte Ester berichtet. Nefkens und Tesser<sup>3)</sup> haben den N-Hydroxyphthalimidester der Aminosäure in die Peptidsynthese eingeführt. Anderson und Mitarbb.<sup>4)</sup> haben kurz darauf den N-Hydroxysuccinimidester als noch günstigeren aktivierten Ester angegeben. Mit letzterem kann die Peptidverknüpfung leicht und praktisch racemisierungsfrei verlaufen. Darüber hinaus erleichtert die Wasserlöslichkeit des N-Hydroxysuccinimids die Reinigung des gebildeten Peptids. Diese aktivierten Ester erwiesen sich für die Peptidsynthese als sehr geeignet und die Synthese der höheren Peptide wurde rasch entwickelt.

Nach diesem Einstufenverfahren wurden 1 bis 1.1 mol des Dicyclohexylcarbodiimids in Dioxan oder Dimethoxyäthan gelöst und mit 1 mol der Acylaminosäure und N-Hydroxysuccinimid bei 0° umgesetzt. N-Hydroxysuccinimidester wurde kristallin in relativ guter Ausbeute erhalten und zur weiteren Peptidverknüpfung verwendet.

Es blieb aber unklar, ob Imid-Stickstoff des N-Hydroxysuccinimids oder der Carboxyl-Kohlenstoff der Acylaminosäure aktiviert wird, d.h. aus welchem von beiden—N-Hydroxysuccinimid oder Acylaminosäure—der Sauerstoff des bei der Umsetzung gebildeten Dicyclohexylharnstoffs stammt. Wir versuchten diese Frage mit  $^{18}\text{O}$ -markierten Substanzen aufzuklären.

Glycin-hydrochlorid wurde in dem mit  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  angereichertem Wasser erhitzt, um den Sauerstoff der Carboxylgruppe gegen  $^{18}\text{O}$  auszutauschen. Das Glycin- $^{18}\text{O}$ -hydrochlorid ( $\text{Gly-}^{18}\text{O}\cdot\text{HCl}$ ) wurde im alkalischen Medium ins Benzyloxycarbonyl-glycin- $^{18}\text{O}$  (Z-Gly- $^{18}\text{O}$ ) überführt. Das 1 molare Dicyclohexylcarbodiimid wurde in einer Dioxanlösung von äquimolaren Z-Gly- $^{18}\text{O}$  und N-Hydroxysuccinimid unter Eiskühlung auf übliche Weise umgesetzt und N-Hydroxysuccinimidester von Z-Gly- $^{18}\text{O}$  (Z-Gly-ONS- $^{18}\text{O}$ ) und der markierte Dicyclohexylharnstoff (DCH- $^{18}\text{O}$ ) als Kristalle erhalten. Das Z-Gly-ONS- $^{18}\text{O}$  wurde mit L-Leucin-äthylester in das Dipeptid Z-Gly- $^{18}\text{O}$ -Leu- $\text{OC}_2\text{H}_5$  überführt.

Die so erhaltenen Substanzen erwiesen sich als ein Gemisch der markierten und nichtmarkierten Verbindungen. Die Molar-Prozente der  $^{18}\text{O}$ - und  $^{18}\text{O}_2$ -Substanzen, die einen  $^{18}\text{O}$  bzw.

\* Diese Arbeit ist dem Andenken von Prof. Dr. Eiji Ochiai gewidmet.

1) Standort: *Juso-honmachi, Yodogawa-ku, Osaka, 532, Japan.*

2) Th. Wieland, W. Schäfer und E. Bokelmann, *Ann. Chem.*, **573**, 99 (1951).

3) G.H.L. Nefkens und G.I. Tesser, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 1263 (1961); G.H.L. Nefkens, G.I. Tesser und R.J.F. Nivard, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, **81**, 683 (1962).

4) G.W. Anderson, J.E. Zimmerman und F.M. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1839 (1964).

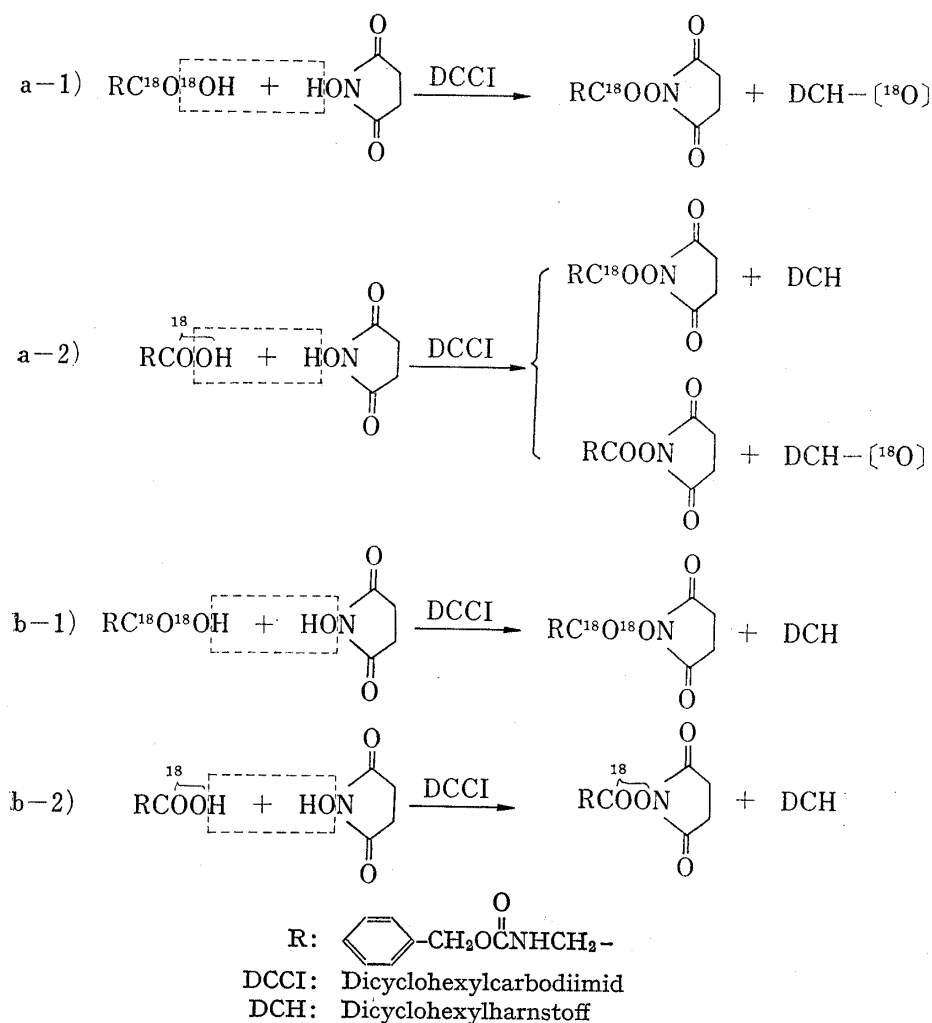
TABELLE. Molar-Prozente von  $^{18}\text{O}$ - und  $^{18}\text{O}_2$ -Verbindungen (%)

	$^{18}\text{O}$ -Verbindung	$^{18}\text{O}_2$ -Verbindung
Gly- $^{18}\text{O}$ ·HCl	$29 \pm 1$	$68 \pm 1$
Z-Gly- $^{18}\text{O}$	$29 \pm 1$	$67 \pm 1$
Z-Gly-ONS- $^{18}\text{O}$	$82 \pm 1$	0
DCH- $^{18}\text{O}$	$81 \pm 1$	—
Z-Gly- $^{18}\text{O}$ -Leu-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	$81 \pm 1$	0

zwei  $^{18}\text{O}$  enthalten, wurden aus der Hauptmassenpeak-Höhe der markierten und authentischen unmarkierten Verbindungen nach Formeln<sup>5)</sup> berechnet und in der Tabelle wiedergegeben.

Aus den Molar-Prozenten der markierten Gly- $^{18}\text{O}$ ·HCl und Z-Gly- $^{18}\text{O}$  folgt, dass zwischen  $^{16}\text{O}$  und  $^{18}\text{O}$  kein nennenswerter Austausch stattfindet.

Das Dicyclohexylcarbodiimid aktiviert bekanntlich die Carbonsäure und ist für die Peptidsynthese erfolgreich verwendet worden und reagiert ebenso mit N-Hydroxysuccinimid unter Bildung von Isoharnstoffderivat.<sup>6)</sup> Für die Kondensation von Z-Gly- $^{18}\text{O}$  und N-Hydroxysuccinimid sind unter Wasserabspaltung zwei Wege denkbar: a) Wasserabspaltung wobei  $\text{H}^+$  aus N-Hydroxysuccinimid und  $\text{OH}^-$  aus Z-Gly- $^{18}\text{O}$  stammt. b) Wasserabspaltung wobei  $\text{H}^+$  aus Z-Gly- $^{18}\text{O}$  und  $\text{OH}^-$  aus N-Hydroxysuccinimid stammt.



5) K. Biemann, "Mass Spektrometry," McGraw Hill Book Company, New York, 1962, S. 224.

6) H. Gross und L. Bilk, *Tetrahedron*, **24**, 6935 (1968).

Weil Z-Gly- $^{18}\text{O}$  als ein Gemisch von  $^{18}\text{O}$  und  $^{18}\text{O}_2$  im Molverhältnis von 29: 67 vorliegt und der Sauerstoffisotop  $^{18}\text{O}$  der  $^{18}\text{O}$ -Substanz in C=O und OH mit der gleichen Wahrscheinlichkeit verteilt war, wurde jede Reaktion weiter in zwei Gleichungen 1 und 2 geteilt (Schema). Experimentell wurde festgestellt, dass der Aktivester Z-Gly-ONS- $^{18}\text{O}$  und das Harnstoffderivat DCH- $^{18}\text{O}$  82 bzw. 81 proz. der  $^{18}\text{O}$ -Substanz und keine  $^{18}\text{O}_2$ -Substanz enthalten. Deshalb können die Reaktionsgleichungen b-1 und b-2 ausgeschlossen werden. Die Molar-Prozente der  $^{18}\text{O}$ -Substanz in Z-Gly-ONS- $^{18}\text{O}$  sowie in DCH- $^{18}\text{O}$  können auf den Molar-Prozent von Z-Gly- $^{18}\text{O}$  als  $67 (\text{aus a } 1) + 29 \times 1/2 (\text{aus a } 2) = 82$  berechnet werden und stimmen mit den gefundenen Werten gut überein. Das bedeutet, dass sich der  $^{18}\text{O}$  in der C=O Gruppe befindet. Die Molar-Prozente der  $^{18}\text{O}$ -Substanz bei dem Z-Gly-ONS- $^{18}\text{O}$  und Z-Gly- $^{18}\text{O}$ -Leu- $\text{OC}_2\text{H}_5$  sind ebenfalls fast gleich.

Um den Sauerstoffaustausch zwischen der Carboxyl- und Hydroxylgruppe zu untersuchen, wurden Z-Gly- $^{18}\text{O}$  und N-Hydroxysuccinimid in Dioxan bei  $0^\circ$  ohne Dicyclohexylcarbodiimid stengelassen. Das zurückgewonnene N-Hydroxysuccinimid enthielt keinen  $^{18}\text{O}$ . Dies bedeutet, dass kein Austausch stattfand. Damit ist bewiesen, dass die Aminosäure durch Abspaltung des Hydroxyls der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid aktiviert wird und dann mit N-Hydroxysuccinimid den Aktivester bildet.

### Experimentelles

Die Schmelzpunkte wurden auf dem Kofler-Heiztischmikroskop (Yanagimoto, Japan) bestimmt und sind unkorrigiert. Die Massenspektren wurden mit dem doppelfokussierenden Massenspektrometer Hitachi RMS-4 mit Direkt-Einlass-System aufgenommen. Die Ionenquellentemperatur betrug  $200^\circ$ , die Ionisierungsenergie 70 eV. Die Peakhöhe in mm auf  $\pm 0.05$  mm genau.

**Glycin- $^{18}\text{O}$ -hydrochlorid (Gly- $^{18}\text{O}$ ·HCl)**—665 mg (6 mmol) Glycinhydrochlorid wurden in 1.5 g  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  (96.9 Atom %) in einer Ampulle gelöst. Die Ampulle wurde unter Kühlung bei  $10^{-2}$  Torr zugeschmolzen und 24 Stdn. auf  $100 \pm 2^\circ$  erhitzt.  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  (1.43 g) wurde bei  $10^{-2}$  Torr abdestilliert und das erhaltene Pulver ohne weitere Reinigung benutzt. Massenspektrum  $m/e$ : 75 (M-HCl): 77 (M-HCl+2): 79 (M-HCl+4)=6.55: 47.40: 116.60.

**Glycin-hydrochlorid**— $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2\text{N} \cdot \text{HCl}$  (mol. Gew., 111.6). Massenspektrum  $m/e$ : 75 (M-HCl): 77 (M-HCl+2): 79 (M-HCl+4)=231.05: 4.00: 0.15.

**Benzyloxycarbonyl-glycin- $^{18}\text{O}$  (Z-Gly- $^{18}\text{O}$ )**—Das oben erhaltene Gly- $^{18}\text{O}$ ·HCl wurde in 1.5 ml 8 N NaOH gelöst und mit 1.03 g (6 mmol) Benzyloxycarbonylchlorid in 1.5 ml 4 N NaOH unter Eiskühlung innerhalb von 10 Min. versetzt. Dann wurde noch 20 Min. gerührt und mit konz. Schwefelsäure auf pH 2.5—3 angesäuert. Die ausgefallenen Kristalle wurden abgesaugt und aus Chloroform umkristallisiert. Ausbeute: 855 mg (75%), Schmp.  $123^\circ$ . Massenspektrum  $m/e$ : 209 (M): 211 (M+2): 213 (M+4)=6.70: 51.30: 118.80.

**Benzyloxycarbonyl-glycin**— $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N}$  (mol. Gew., 209.2). Massenspektrum  $m/e$ : 209 (M): 211 (M+2): 213 (M+4)=261.00: 4.35: 0.15.

**Darstellung von N-Hydroxysuccinimidester- $^{18}\text{O}$  (Z-Gly-ONS- $^{18}\text{O}$ ) und Dicyclohexylharnstoff- $^{18}\text{O}$  (DCH- $^{18}\text{O}$ ) aus Z-Gly- $^{18}\text{O}$ , Dicyclohexylcarbodiimid und N-Hydroxysuccinimid**—835 mg (4 mmol) Z-Gly- $^{18}\text{O}$  und 463 mg (4 mmol) N-Hydroxysuccinimid in 8 ml Dioxan wurden mit 826 mg (4 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid bei  $0^\circ$  unter Rühren versetzt und 12 Stdn. im Kühltisch stengelassen. Das ausgeschiedene DCH- $^{18}\text{O}$  (880 mg, 3.9 mmol) wurde abgesaugt und mit Äther gewaschen. Das Filtrat und Äther wurden im Vakuum eingedampft. Nach Umkristallisieren aus Methylenchlorid-Petroläther (1:1) wurde Z-Gly-ONS- $^{18}\text{O}$  als farblose Kristalle erhalten. Ausbeute: 1.101 g (90%), Schmp.  $108\text{—}110^\circ$ . Massenspektrum  $m/e$ : 306 (M): 308 (M+2): 310 (M+4)=108.40: 489.35: 10.70.

**N-Hydroxysuccinimidester von Z-Glycin**— $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_6\text{N}_2$  (mol. Gew., 306.3). Massenspektrum  $m/e$ : 306 (M): 308 (M+2): 310 (M+4)=139.30: 4.50: 0.

DCH- $^{18}\text{O}$  wurde aus 30 ml Methanol umkristallisiert. Ausbeute: 622 mg (70%), Farblose Kristalle von Schmp.  $194\text{—}195^\circ$ . Massenspektrum  $m/e$ : 224 (M): 226 (M+2)=10.30: 43.85.

**Dicyclohexylharnstoff**— $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{ON}_2$  (mol. Gew., 224.3). Massenspektrum  $m/e$ : 224 (M): 226 (M+2)=83.20: 0.

**Z-Glycyl- $^{18}\text{O}$ -leucin-äthylester (Z-Gly- $^{18}\text{O}$ -Leu- $\text{OC}_2\text{H}_5$ )**—295 mg (1.5 mmol) L-Leu- $\text{OC}_2\text{H}_5 \cdot \text{HCl}$  und 303 mg (3 mmol) Triäthylamin wurden in 2 ml Dimethoxyäthan suspendiert und mit 310 mg (1 mmol) Z-Gly-ONS- $^{18}\text{O}$  in 2 ml Dimethoxyäthan versetzt und 18 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert, der Rückstand mit 3 ml Wasser versetzt und 3 mal mit je 15 ml Essigester ausgeschüttelt. Die Essigesterlösung wurde mit 10 ml gesättigter Kochsalzlösung und 2 mal mit je 10 ml

Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und rohes Peptid gewonnen. Ausbeute: 265 mg (75%), Schmp. 210—214° (aus Petroläther). Massenspektrum  $m/e$ : 350 (M): 352 (M+2)=10.75: 46.10.

**Z-Glycyl-leucin-äthylester**— $C_{18}H_{26}O_5N_2$  (mol. Gew., 350.3). Massenspektrum  $m/e$ : 350 (M): 352 (M+2)=62.25: 1.70.

**Zur Prüfung des Sauerstoffaustausches zwischen Z-Gly- $[^{18}O]$  und N-Hydroxysuccinimid**—9 mg (0.04 mmol) Z-Gly- $[^{18}O]$  und 5 mg (0.04 mmol) N-Hydroxysuccinimid in 1 ml Dioxan wurden bei 0°, 12 Stdn. gerührt. Der Ansatz wurde auf Dünnschichtplatte (Merck F<sub>254</sub>) mit Chloroform-Methanol-Eisessig (9:1:0.5) als Fließmittel chromatographisch gereinigt. Die zurückgewonnenen Z-Gly- $[^{18}O]$  und N-Hydroxysuccinimid enthielten  $^{18}O$  im Verhältnis der Ausgangsmaterialien.

**Anerkennung** Wir danken herzlich dem Fräulein A. Oka in unserer chemischen Abteilung für die Aufnahme der Massenspektren.