

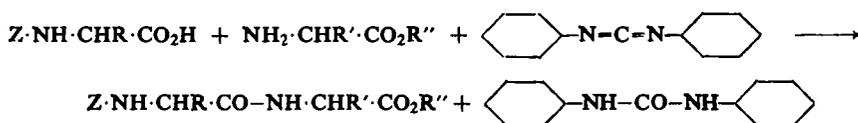
HELGA SCHÜSSLER<sup>1)</sup> und HELMUT ZAHN

## Beitrag zur Reaktionsweise von Carbobenzoxy-aminosäuren mit Dicyclohexylcarbodiimid \*2)

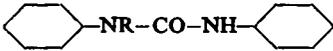
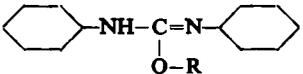
Aus dem Deutschen Wollforschungsinstitut an der Technischen Hochschule Aachen  
(Eingegangen am 20. Oktober 1961)

Symm. Acyl-aminosäureanhydride wurden als Intermediärprodukte bei der Peptidsynthese mittels Dicyclohexylcarbodiimids isoliert und anschließend mit Aminosäureestern zu Peptiden umgesetzt. Ein schon von KHORANA<sup>3)</sup> diskutierter Reaktionsmechanismus wird damit wahrscheinlich gemacht<sup>4)</sup>.

Eine der elegantesten Methoden zur Knüpfung der Peptidbindung ist die von J. C. SHEEHAN und G. P. HESS<sup>5)</sup> eingeführte Carbodiimidmethode, der folgendes Schema zugrunde liegt:



Trotz der einfachen Reaktionsgleichung ist der Mechanismus noch nicht eindeutig geklärt. H. G. KHORANA<sup>6)</sup> diskutiert als mögliche aktive Zwischenstufen:

- 1)  *N*-Acyl-harnstoff
- 2)  *O*-Acyl-lactim
- 3)  $\text{R}-\text{O}-\text{R}$  symm. Acyl-aminosäureanhydrid

### BILDUNG VON ACYL-AMINOSÄUREANHYDRID

In seiner 1953 veröffentlichten Arbeit zeigt KHORANA<sup>7)</sup>, daß Carbonsäuren mit Carbodiimiden zunächst unter 1.2-Addition ein Anlagerungsprodukt und dann ein Anhydrid oder

\*<sup>1)</sup> Verwendete Abkürzungen: DCC = Dicyclohexylcarbodiimid, DCH = Dicyclohexylharnstoff, Z = Carbobenzoxy.

<sup>1)</sup> Teil der Dissertat. H. SCHÜSSLER, Techn. Hochschule Aachen 1960.

<sup>2)</sup> 23. Mitteil. über Peptide; 22. Mitteil.: J. KUNDE und H. ZAHN, Liebigs Ann. Chem. **646**, 137 [1961].

<sup>3)</sup> M. SMITH, J. G. MOFFAT und H. G. KHORANA, J. Amer. chem. Soc. **80**, 6204 [1958].

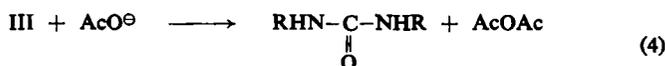
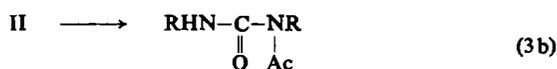
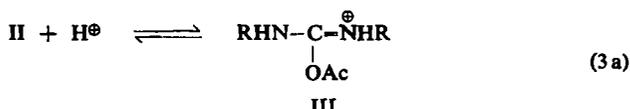
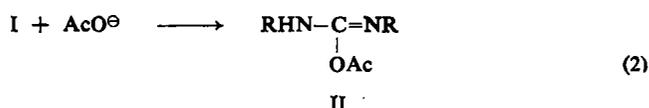
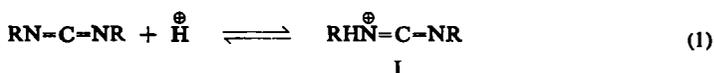
<sup>4)</sup> Vgl. Diskussionsbemerkung H. ZAHN, 3. Europäisches Peptid-Symposium, Basel, 5.—8. Sept. 1960.

<sup>5)</sup> J. Amer. chem. Soc. **77**, 1067 [1955].

<sup>6)</sup> Chem. and Ind. **1955**, 1087.

<sup>7)</sup> Chem. Reviews **53**, 145 [1953].

einen substituierten Harnstoff bilden. In einer neueren Arbeit untersucht der gleiche Autor<sup>3)</sup> den Einfluß einer tertiären Base auf die Anhydridbildung und formuliert die Reaktion wie folgt:



Die Reaktion beginnt mit dem Angriff des Protons (1) und der Anlagerung des Anions an das positivierete C-Atom (2). Sind genügend H-Ionen vorhanden, so kann sich ein weiteres Proton an den noch freien Stickstoff anlagern (3a). In der letzten Stufe bilden sich Anhydrid und Harnstoff (4). Ist die H-Ionenkonzentration zu gering, so findet eine *O,N*-Acylwanderung statt, und man erhält einen Acyl-harnstoff (3b).

Die Darstellung von Acyl-aminosäureanhydriden ist bereits nach verschiedenen Methoden möglich. Mehrere Autoren beschreiben die Bildung der symmetrischen Anhydride bei der Zersetzung der gemischten Anhydride aus Carbobenzoxy-aminosäuren und anorganischen Säuren oder Ameisensäure<sup>8)</sup>.

J. F. ARENS<sup>9)</sup> fand, daß aus Acyl-aminosäuren bei der Einwirkung von Äthoxyacetylen leicht Acyl-aminosäureanhydride entstehen. H. GIBIAN und E. KLEIGER<sup>10)</sup> stellten mit Hilfe von DCC Carbobenzoxy-glutaminsäure-anhydrid dar.

Bei Arbeiten über die Bildung des Acyl-harnstoffs isolierten I. MURAMATSU und A. HAGITANI<sup>11)</sup> nach der Reaktion von DCC mit Acyl-aminosäuren symmetrische Acyl-aminosäureanhydride, nämlich Carbobenzoxy- $\beta$ -alanin-anhydrid und Carbobenzoxy-glutaminsäure- $\gamma$ -methylester-anhydrid, die dann mit Aminosäureestern Peptidderivate bildeten.

Unabhängig von den genannten japanischen Autoren fanden auch wir, daß bei Einwirkung von DCC auf Carbobenzoxy-glycin augenblicklich Dicyclohexylharnstoff\*)

\*) W. HAAS beobachtete die Bildung von DCH bei der Reaktion von DCC mit Carbobenzoxy-nitroarginin schon vor dem Zusatz des Esters. Trotzdem wurde die übliche Ausbeute an Peptidderivat erhalten. Er vermutete deswegen ebenfalls ein symmetrisches Anhydrid als intermediäre aktive Stufe (Dissertat. Techn. Hochschule Aachen 1959).

<sup>8)</sup> a) TH. WIELAND, W. KERN und R. SEHRING, Liebigs Ann. Chem. 569, 117 [1950]; b) J. C. SHEEHAN und V. S. FRANK, J. Amer. chem. Soc. 72, 1312 [1950]; c) I. v. BRUNN-LEUBE und G. SCHRAMM, Chem. Ber. 89, 2045 [1956].

<sup>9)</sup> H. J. PANNEMAN, A. F. MARX und J. F. ARENS, Recueil Trav. chim. Pays-Bas 78, 487 [1959].

<sup>10)</sup> Liebigs Ann. Chem. 641, 145 [1961].

<sup>11)</sup> J. chem. Soc. Japan, pure Chem. Sect. [Nippon Kagaku Zassi] 80, 1497 [1959].

ausfällt und Carbobenzoxy-glycin-anhydrid entsteht. Dieses Anhydrid ist ziemlich beständig und kann aus trockenem Benzol umkristallisiert werden. Auf gleiche Weise wurde Carbobenzoxy-valin-anhydrid dargestellt, das sich ebenfalls aus Benzol umkristallisieren läßt. Carbobenzoxy-leucin-anhydrid und Carbobenzoxy-prolin-anhydrid wurden nur als Öle gewonnen. Auch bei Carbobenzoxy-dipeptidsäuren ist eine derartige Anhydridbildung möglich, was die Darstellung von Carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanin-anhydrid beweist.

Läßt man Carbobenzoxy-glycin in Gegenwart von Triäthylamin reagieren, so unterbleibt zunächst die Abscheidung von DCH. Nach 29 Stdn. hatten sich erst 17% DCH gebildet. Nach einigen Tagen schied sich aus der Lösung Carbobenzoxy-glycyl-dicyclohexylharnstoff ab, wie dies nach Gleichung (3b) bei geringer Protonenkonzentration zu erwarten ist. Dieser Acyl-harnstoff wurde bereits von H. ZAHN und J. F. DIEHL<sup>12)</sup> beschrieben. Bei der stufenweisen Synthese von Carbobenzoxy-L-threonyl-L-prolyl- $\epsilon$ -tosyl-L-lysyl-L-alanin-methylester konnten wir ähnliches beobachten<sup>13)</sup>. In Gegenwart von Triäthylamin schieden sich nur 40 bis 50% der theoretischen Menge DCH ab, und die Ausbeuten an Peptidderivat lagen bei rund 40%. Dagegen erreichte man eine fast 100-proz. Ausbeute an DCH und Ausbeuten an Peptidderivat zwischen 70 und 80%, wenn ein Überschuß von Triäthylamin vermieden wurde.

#### AMINOLYSE DER SYMM. ACYL-AMINOSÄUREANHYDRIDE DURCH AMINOSÄUREESTER

Es wurde nun untersucht, ob auch bei der Peptidsynthese Carbobenzoxy-aminosäureanhydride als Zwischenprodukte entstehen und dann mit Aminosäureester zum Peptidderivat reagieren. Symmetrische Anhydride müssen ähnliche Eigenschaften haben wie die unsymmetrischen, die in zahlreichen Varianten zur Peptidsynthese verwandt werden<sup>14)</sup>.

Um die Reaktionsfähigkeit der Carbobenzoxy-aminosäureanhydride zu prüfen, wurde kristallines Carbobenzoxy-glycin-anhydrid mit Phenylalanin-äthylester in äquivalenten Mengen umgesetzt. Schon nach 5 Min. konnte die Aminokomponente chromatographisch nicht mehr nachgewiesen werden. Aus der Lösung wurde Carbobenzoxy-glycyl-phenylalanin-äthylester in 88-proz. Ausbeute isoliert. Bei der Umsetzung von Carbobenzoxy-valin-anhydrid mit Phenylalanin-äthylester gewann man Carbobenzoxy-valyl-phenylalanin-äthylester ebenfalls in 88-proz. Ausbeute.

Auch symmetrische Carbobenzoxy-dipeptidsäure-anhydride reagieren mit Aminosäureestern in gleicher Weise. So erhielt man bei der Reaktion von äquivalenten Mengen Carbobenzoxy-glycyl-phenylalanin-anhydrid mit Phenylalanin-äthylester in 75-proz. Ausbeute Carbobenzoxy-glycyl-phenylalanyl-phenylalanin-äthylester.

Nach diesen Versuchen scheint es möglich, daß ein symm. Acyl-aminosäureanhydrid als aktiviertes Zwischenprodukt bei der Carbodiimidmethode auftritt, das mit Aminosäureestern Peptide bildet. Die dabei frei werdende Carbobenzoxy-aminosäure reagiert

<sup>12)</sup> Z. Naturforsch. 12b, 85 [1957].

<sup>13)</sup> H. ZAHN und H. SCHÜSSLER, Liebigs Ann. Chem. 641, 176 [1961].

<sup>14)</sup> TH. WIELAND und H. BERNHARD, Liebigs Ann. Chem. 572, 190 [1951]; R. A. BOISSONNAS, Helv. chim. Acta 34, 874 [1951]; R. J. VAUGHAN, J. Amer. chem. Soc. 73, 3547 [1951].

erneut mit DCC zum symmetrischen Anhydrid, das sich dann wieder mit dem Aminosäureester umsetzt.

Verlaufen zwei Synthesen über das gleiche aktivierte Zwischenprodukt, so sollte die Racemisierung bei Verwendung von optisch aktiven Aminosäuren gleich groß sein. Um zu untersuchen, ob bei der Carbodiimidmethode das reagierende Produkt das symm. Acyl-aminosäureanhydrid ist, wurden die Drehwerte, gemessen in Methanol, des über das symm. Anhydrid dargestellten Carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanin-äthylesters mit dem auf dem üblichen Weg nach der Carbodiimidmethode gewonnenen Präparat verglichen. Die gefundenen Werte stimmen überein.

Carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanin-äthylester

Methode	$[\alpha]_D^{25}$	Schmp.
Symm. Anhydride	$-8.5^\circ (\pm 1.0)$	132–134°
DCC	$-7.5^\circ (\pm 0.5)$	126–130°
<i>p</i> -Nitrophenylester *)	$-8.0^\circ (\pm 0.5)$	129–137°

\*) Wir danken FrI. Dipl.-Chem. M. HENZ verbindlichst für die Überlassung des Peptidderivats.

Damit besteht die Möglichkeit, mit Hilfe der symm. Anhydride längere Peptide mit *N*-Acyl-dipeptiden racemisierungsfrei zu verknüpfen.

Wir danken dem BUNDESWIRTSCHAFTSMINISTERIUM (Forschungsvorhaben J 399), dem INTERNATIONALEN WOLLSEKRETARIAT, der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT und dem FONDS DER CHEMISCHEN INDUSTRIE für die Unterstützung der vorliegenden Arbeit. Für wertvolle Hinweise und die Durchsicht des Manuskriptes wird Herrn Dr. E. SCHNABEL verbindlichst gedankt.

### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

*Z-Glycyl-dicyclohexylharnstoff*: Zu einer Lösung von 2.1 g (10 mMol) *Z-Glycin* in 60 ccm Acetonitril wurden 1.5 ccm (10 mMol) Triäthylamin und 2.1 g (10 mMol) DCC in 20 ccm Acetonitril gegeben. Nach 29stdg. Stehenlassen im Kühlschrank hatten sich 0.4 g DCH (17%) gebildet, der abfiltriert wurde. Aus dem Filtrat schied sich bei Raumtemperatur farblose Kristalle ab, die aus Essigester/Petroläther umkristallisiert wurden. Ausb. 1.65 g (39% d. Th.), Schmp. 142–143° (Lit.<sup>12</sup>): 143.5–145.5°.

$C_{23}H_{33}N_3O_4$  (415.5) Ber. C 66.48 H 8.01 N 10.11 Gef. C 66.25 H 8.35 N 9.90

*Z-Glycin-anhydrid*: 2.1 g (10 mMol) *Z-Glycin* wurden in 60 ccm Acetonitril gelöst und zu einer Lösung von 1.0 g (5 mMol) DCC in 10 ccm Acetonitril gegeben. Nach 17 Stdn. wurde der ausgefallene DCH abgesaugt und das Filtrat i. Vak. eingengt. Der weiße krist. Rückstand wurde aus trockenem Benzol umkristallisiert. Ausb. an DCH: 1.01 g (100% d. Th.), an *Z-Glycin-anhydrid*: 1.52 g, Schmp. 108–114° (Lit.<sup>8a</sup>): 118°.

$C_{20}H_{20}N_2O_7$  (440.4) Ber. C 59.99 H 5.04 N 7.00 Gef. C 60.24 H 5.25 N 6.84

*Umsetzung von Z-Glycin-anhydrid mit DL-Phenylalanin-äthylester*: 1.42 g (3.3 mMol) *Z-Glycin-anhydrid* wurden mit DL-Phenylalanin-äthylester, der aus 0.8 g (3.4 mMol) des Hydrochlorides mit 0.55 ccm (3.4 mMol) Triäthylamin freigesetzt wurde, in Acetonitril umgesetzt. Nach 2 Stdn. wurde die Reaktionslösung i. Vak. eingengt. Der ölige Rückstand

wurde in Essigester gelöst und mit 0.1 *n* HCl und gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung ausgeschüttelt. Die Essigesterschicht wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und i. Vak. eingedampft. Es blieb eine feste, weiße Substanz zurück. Ausb. 1.2 g (88% d. Th.). Schmp. 87–88° (Lit.<sup>15)</sup>: 92°) (aus 50-proz. Äthanol).

C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (384.4) Ber. C 65.61 H 6.29 N 7.29 Gef. C 65.62 H 6.38 N 7.16

*Z-L-Valin-anhydrid*: 2.5 g (10 mMol) *Z-L-Valin* wurden in 60 ccm Acetonitril gelöst und mit einer Lösung von 1.0 g (5 mMol) DCC in 10 ccm Acetonitril versetzt. Nach 12 Stdn. wurde der ausgefallene DCH abgesaugt und das Filtrat i. Vak. eingedampft. Der weiße feste Rückstand wurde aus trockenem Benzol umkristallisiert. Ausb. an DCH: 0.9 g (90% d. Th.), an *Z-L-Valin-anhydrid*: 1.57 g (67% d. Th.), Schmp. 96–99°.

C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (484.5) Ber. C 64.45 H 6.66 N 5.78 Gef. C 64.29 H 6.62 N 5.72

*Umsetzung von Z-Valin-anhydrid mit DL-Phenylalanin-äthylester*: DL-Phenylalanin-äthylester wurde aus 0.7 g (3 mMol) des Hydrochlorids mit 0.5 ccm (3 mMol) Triäthylamin freigesetzt und zu 1.5 g (3 mMol) *Z-Valin-anhydrid*, das in Acetonitril gelöst war, gegeben. Nach 24 Stdn. wurde die Reaktionslösung i. Vak. eingeengt. Der feste Rückstand wurde in Essigester gelöst und mit 0.1 *n* HCl und gesätt. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung ausgeschüttelt. Nach dem Eindampfen i. Vak. blieb ein weißer, fester Rückstand, der zweimal aus Essigester/Petroläther umkristallisiert wurde. Ausb. 1.15 g (88.5% d. Th.), Schmp. 139–142°.

C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (426.5) Ber. C 67.58 H 7.09 N 6.57 Gef. C 67.80 H 7.05 N 6.53

*Z-Glycyl-L-phenylalanin-anhydrid*: 0.9 g (2.5 mMol) *Z-Glycyl-L-phenylalanin* wurden in 40 ccm Acetonitril gelöst, in Eis abgekühlt und mit 0.25 g (1.25 mMol) DCC, in Acetonitril gelöst, versetzt. DCH fiel sofort aus und wurde nach 12 Stdn. abgesaugt. Das Filtrat vom DCH wurde i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde in trockenem Benzol gelöst und mit wenig Petroläther versetzt. Im Kühlschrank kristallisierte die Substanz aus. Ausb. 0.6 g (68% d. Th.), Schmp. 66–68°.

C<sub>38</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub> (694.7) Ber. C 65.70 H 5.51 N 8.07 Gef. C 65.53 H 5.55 N 8.11

*Umsetzung von Z-Glycyl-L-phenylalanin-anhydrid mit Phenylalanin-äthylester*

A. DL-Phenylalanin-äthylester wurde aus 0.2 g (0.8 mMol) des Hydrochlorids mit 0.12 ccm (0.8 mMol) Triäthylamin freigesetzt und zu einer Acetonitrillösung von 0.5 g (0.7 mMol) *Z-Glycyl-L-phenylalanin-anhydrid* gegeben. Nach dem Einengen i. Vak. wurde der Rückstand in Essigester gelöst und mit 0.1 *n* HCl und gesätt. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung ausgeschüttelt. Die über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknete Essigesterschicht wurde i. Vak. eingedampft. Es blieb 0.5 g eines Öles zurück, das aus Essigester/Petroläther umkristallisiert wurde. Ausb. 0.23 g (60% d. Th.), Schmp. 107–110°.

B. I. *Z-Glycyl-L-phenylalanin-anhydrid* wurde mit L-Phenylalanin-äthylester wie bei A. umgesetzt, jedoch unter Eiskühlung. Ausb. 0.4 g (75% d. Th.), Schmp. 132–134°,  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-8.5 \pm 1.0^\circ$  ( $c = 2$ , in Methanol).

C<sub>30</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> (531.6) Ber. C 67.78 H 6.25 N 7.90 Gef. C 68.05 H 6.13 N 8.08

B. II. L-Phenylalanin-äthylester wurde aus 0.3 g (1.3 mMol) des Hydrochlorids mit 0.2 ccm (1.3 mMol) Triäthylamin freigesetzt und einer Acetonitrillösung von 0.9 g (2.5 mMol) *Z-Glycyl-L-phenylalanin* zugefügt. Zu dieser Lösung wurde 0.5 g (2.5 mMol) DCC gegeben. Nach 24stdg. Aufbewahren im Kühlschrank wurde DCH abfiltriert. Das Filtrat wurde wie üblich aufgearbeitet. Ausb. 1.6 g (94% d. Th.). Schmp. 126–130°,  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-7.5 \pm 0.5^\circ$ . ( $c = 2$ , in Methanol).

<sup>15)</sup> W. GRASSMANN und E. WÜNSCH, Chem. Ber. 91, 449 [1958].