

Friedrich Weygand, Axel Prox und Wolfgang König

Racemisierung der vorletzten carboxylendständigen Aminosäure bei Peptidsynthesen*)

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Hochschule München

(Eingegangen am 6. November 1965)

Durch Untersuchung der Synthese von Z-L-Ile-L-Phe-L-Val-OtBu aus Z-L-Ile-L-Phe-OH und H-L-Val-OtBu mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI) konnte der früher erhobene Befund bestätigt werden, daß nicht nur die durch DCCI aktivierte Aminosäure (Phe), sondern auch die vorletzte (Ile) teilweise racemisiert wird.

Nach der Verknüpfung von Z-L-Leu-L-Phe-L-Ala-OH mit H-L-Phe-OtBu mit Hilfe von DCCI enthielt das nach Abspaltung der Schutzgruppen durch Partialhydrolyse mit 8.5*n* methanolischer HCl erhaltene Dipeptid Leu-Phe nach der gaschromatographischen Analyse 9.6% an D-Phe, während dasselbe Dipeptid nach der Partialhydrolyse des Ausgangstripeptids nur 1.6% besaß¹⁾. Der Mehrgehalt von 8% an D-Phe nach der Synthese des Tetrapeptids wurde so interpretiert, daß nicht nur die mittels DCCI aktivierte Aminosäure, im vorliegenden Fall Alanin, sondern auch die vorletzte, Phenylalanin, zum Teil bei der Peptidsynthese racemisiert wird²⁾. Bei der Methode der gemischten Anhydride oder mit Äthoxyacetylen war der Anteil an D-Phe im Tetrapeptid nach Abzug des Blindwertes nur 1.2–1.5%.

Um diese bei Peptidsynthesen bisher nicht festgestellte Racemisierung der vorletzten Aminosäure weiter zu sichern, wurden Versuche mit L-isoleucinhaltigen Peptiden ausgeführt. Wird diese Aminosäure am α -C-Atom racemisiert, so entsteht D-allo-Isoleucin, das sich neben L-Isoleucin gaschromatographisch (in Form des 2.2-Bis-trifluormethyl-oxazolidons-(5)) leicht nachweisen und bestimmen läßt¹⁾.

Z-L-Ile-L-Phe-OH wurde mit H-L-Val-OtBu mittels DCCI zu Z-L-Ile-L-Phe-L-Val-OtBu umgesetzt (s. Tab. 1). Nach Abspaltung der Schutzgruppen mit Trifluoressigsäure lieferte die Totalhydrolyse ein Isoleucin, das, über das entspr. Bis-trifluormethyl-oxazolidon bestimmt, 6.3% an D-allo-Isoleucin aufwies. Da die aminoendständige Aminosäure aus Peptiden bei der Totalhydrolyse racemisierungsfrei erhalten wird¹⁾, ist somit der frühere Befund, daß auch die vorletzte Aminosäure bei Peptidsynthesen mit DCCI in geringem Umfange racemisiert wird, auf eine unabhängige Weise bestätigt.

Hingegen fand bei demselben Test bei der Methode der gemischten Anhydride oder mit [tert.-Butyl-äthynyl]-dimethylamin im Isoleucin keine Racemisierung statt,

*) Abkürzungen: Z = Benzyloxycarbonyl; DCCI = Dicyclohexylcarbodiimid; HONP = *p*-Nitro-phenol.

¹⁾ F. Weygand, W. König, A. Prox und K. Burger, Chem. Ber. **99**, 1443 (1966), vorstehend.

²⁾ A. Prox, F. Weygand, W. König und L. Schmidhammer, Proc. VI. Europ. Peptide Symposium, Athen, Sept. 1963, Pergamon Press, Oxford, im Druck.

offenbar weil die in beiden Fällen wirksamen Anhydride schneller mit dem Aminosäureester reagieren als das aus dem Z-Dipeptidester mit DCCI zunächst entstehende Addukt.

Die bei der Synthese des Tetrapeptids Z-L-Leu-L-Phe-L-Ala-L-Phe-OH aus Z-L-Leu-L-Phe-L-Ala-OH und H-L-Phe-OtBu gefundenen 1.2–1.5% L-Leu-D-Phe²⁾ können also nicht aus der Synthese stammen. Sie rühren von der Racemisierung bei der Partialhydrolyse her, die, wie wir zeigen konnten¹⁾, bei Tetrapeptiden größer ist als bei Tripeptiden. Somit sollten von den oben erwähnten 8% (s. 1. Absatz) noch weitere 1.5% abgezogen werden, wonach der Wert von 6.5% mit dem aus dem Isoleucinversuch ermittelten übereinstimmt.

Tab. 1. Racemisierung im L-Isoleucin bei der Synthese von Z-L-Ile-L-Phe-L-Val-OtBu aus Z-L-Ile-L-Phe-OH und H-L-Val-OtBu

Methode	Zusätze Mol-%	Temp.	Zeit (Std.)	% D-allo- Isoleucin
DCCI	—	20°	16	6.3
DCCI	Imidazol 100	20°	16	2.5
DCCI	Triäthylamin 100	20°	16	3.2
gem. Anhydr. —OCO ₂ C ₂ H ₅	—	–10° a)	16	0
[tert.-Butyl-äthynyl]- dimethylamin	—	35°	1.5	0

a) Anhydridbildung bei –10°, nach Zusatz des Esters langsames Aufwärmen auf 20°.

Da häufig bei der Synthese von länger-kettigen Peptiden zwecks Vermeidung der Racemisierung bei der Verknüpfung von Peptiden als carboxylendständige Aminosäure Glycin gewählt wird, war von besonderem Interesse, ob bei der Umsetzung von Z-L-Ile-Gly-OH mit H-L-Val-OtBu auch im Isoleucin eine Racemisierung festzustellen ist oder nicht. Es ergab sich, daß im Isoleucin nach der Peptidsynthese mit DCCI etwa 0.5% D-allo-Isoleucin gefunden wurde, während bei Anwendung der Methode der gemischten Anhydride kein D-allo-Isoleucin auftrat.

Die Befunde über die Racemisierung der vorletzten Aminosäure können entsprechend den Vorstellungen von *Neuberger*³⁾ gedeutet werden, wonach nach der Azlactonbildung auch die vorletzte Aminosäure der Racemisierung unterliegt. Diese Deutung beruht auf einem Versuch von *Bergmann* und *Zervas*⁴⁾, die Acetyl-L-Phe-L-Tyr-OH mit Acetanhydrid behandelten und nach der Totalhydrolyse im Phenylalanin Racemisierung fanden. Wir haben daher drei Z-L-Ile-Dipeptide mit dem ebenfalls Azlactone liefernden DCCI⁵⁾ und außerdem mit Acetanhydrid umgesetzt und den Anteil an D-allo-Isoleucin nach der Totalhydrolyse bestimmt.

³⁾ *A. Neuberger*, *Advances in Protein Chemistry* **4**, 297 (1948), und zwar S. 359.

⁴⁾ *M. Bergmann* und *L. Zervas*, *Biochem. Z.* **203**, 280 (1929).

⁵⁾ Zur Azlactonbildung mit DCCI vgl. *J. Z. Siemion* und *K. Nowak*, *Roczniki Chem.* **35**, 979 (1961), *C. A.* **56**, 6084 (1962); *M. Goodman* und *W. J. Gahren*, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 3028 (1965); *E. Schnabel*, *Liebigs Ann. Chem.* **688**, 238 (1965); Bildung von 2-Trifluormethyl-pseudooxazolonen-(5) aus *N*-TFA-Aminosäuren: *F. Weygand*, *Proc. VI. Europ. Peptide Symposium*, Athen, Sept. 1963, Pergamon Press, Oxford, im Druck.

Während die Ausgangspeptide nach der Totalhydrolyse kein D-allo-Isoleucin enthielten¹⁾, konnte nach der Behandlung von Z-L-Ile-L-Phe-OH sowohl mit DCCI als auch mit Acetanhydrid etwa 24% an D-allo-Isoleucin festgestellt werden (s. Tab. 2). Bei den analogen Versuchen mit Z-L-Ile-Gly-OH ergaben sich nach der DCCI-Behandlung nur 2.6% und nach der Umsetzung mit Acetanhydrid nur 1% an D-allo-Isoleucin. Ganz frei von D-allo-Isoleucin war das Totalhydrolysat von Z-L-Ile-L-Pro-OH nach der Behandlung mit Acetanhydrid. In Übereinstimmung mit diesem Versuch trat bei der Umsetzung von Z-L-Ile-L-Pro-OH mit H-L-Val-OtBu nach der Methode der gemischten Anhydride keine Racemisierung im Isoleucin auf.

Tab. 2. Racemisierung im L-Isoleucin nach der Behandlung verschiedener Z-L-Ile-Dipeptide mit DCCI oder Acetanhydrid

Peptid	Reagenz	Lösungs- mittel	Temp.	Zeit (Stdn.)	% D-allo- Isoleucin
Z-L-Ile-L-Phe-OH	DCCI	THF	20°	24	23.7
Z-L-Ile-L-Phe-OH	Acetanhydrid	Eisessig	80°	0.5	24.5
Z-L-Ile-Gly-OH	DCCI	THF	20°	23	2.6
Z-L-Ile-Gly-OH	Acetanhydrid	Eisessig	80°	0.5	1.0
Z-L-Ile-L-Pro-OH	Acetanhydrid	Eisessig	80°	0.5	0

Die leichte gaschromatographische Bestimmbarkeit von D-allo-Isoleucin neben L-Isoleucin in Totalhydrolysaten gestattet auch die Prüfung der Frage, bei welchem Schritt der Herstellung von Z-Dipeptid-ONP aus Z-As²-OH und H-As¹-ONP mit DCCI⁶⁾ Racemisierung auftritt. Bei Anwendung der Methode der gemischten Anhydride wurde schon über die dabei stattfindende Racemisierung berichtet⁷⁾.

Aus Z-L-Ile-OH und *p*-Nitro-phenol wurde mit DCCI Z-L-Ile-ONP hergestellt, der Z-Rest wurde mit HBr/Eisessig abgespalten und das krist. Hydrobromid mit halbkonz. Salzsäure auf 90° erhitzt. Das resultierende Isoleucin war frei von D-allo-Isoleucin. Das Hydrobromid wurde nun in Acetonitril bei 0° mit der äquiv. Menge Triäthylamin versetzt und bei 0° i. Vak. eingedampft. Nach der Hydrolyse wurde wiederum kein D-allo-Isoleucin gefunden. Schließlich wurde Z-L-Ala-OH und H-L-Ile-ONP·HBr mit DCCI unter Zusatz von 1 Äquiv. Triäthylamin umgesetzt, der Z-Rest mit Trifluoressigsäure abgespalten und das Dipeptid einer Totalhydrolyse unterworfen. Nunmehr fand man 0.7% D-allo-Isoleucin. Der Betrag stieg auf 2.3%, als der Ansatz vor der Aufarbeitung mit DCCI 13 Tage bei 20° stehen blieb. Diese Versuche beweisen, daß das fertige Z-L-Ala-L-Ile-ONP racemisiert wird.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Förderung dieser Untersuchungen und Fräulein I. Kessler für die gaschromatographischen Versuche und ihre Auswertung.

⁶⁾ M. Goodman und K. C. Stueben, J. Amer. chem. Soc. **81**, 3980 (1959).

⁷⁾ H. C. Beyerman, W. Maassen van den Brink, F. Weygand, A. Prox, W. König, L. Schmidhammer und E. Nintz, Recueil Trav. chim. Pays-Bas **84**, 213 (1965).

Beschreibung der Versuche

1. *N-Benzoyloxycarbonyl-L-isoleucyl-L-phenylalanin-tert.-butylester*: 5 mMol *Z-L-Ile-OH*, dargestellt nach *Bergmann* und *Zervas*⁸⁾, und 5 mMol *Triäthylamin* wurden in 10 ccm absol. THF gelöst und auf -35° abgekühlt. Unter Rühren ließ man bei dieser Temp. 5 mMol *Chlorameisensäure-äthylester*, gelöst in 5 ccm THF, hinzutropfen. Dabei fiel *Triäthylammoniumchlorid* aus. Nach beendeter Zugabe wurde der Ansatz in ein Eis/Kochsalzbad von -10° gebracht und darin 10 Min. belassen. Danach wurde erneut auf -35° gekühlt und eine ebenfalls auf -35° gekühlte Lösung von 5 mMol *L-Phenylalanin-tert.-butylester* in 10 ccm absol. Tetrahydrofuran zugegeben. Nach wenigen Min. brachte man wieder in das auf -10° gehaltene Eis/Kochsalzbad und ließ über Nacht auf Raumtemperatur kommen. Nachdem vom *Triäthylammoniumchlorid* abgesaugt war, wurde i. Vak. eingedampft, der Rückstand in Essigester aufgenommen und mit 0.5 *n* HCl, gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft. Der Rückstand kristallisierte beim Anreiben mit Petroläther. Ausb. 74%, Schmp. 127–129°, $[\alpha]_{546}^{20}$: -26.2° ($c = 1$, in Methanol).

$C_{27}H_{36}N_2O_5$ (468.6) Ber. C 69.20 H 7.74 N 5.98 Gef. C 69.17 H 7.93 N 5.93

Zur Prüfung auf sterische Reinheit des *L-Isoleucins* wurden durch Erhitzen mit *Trifluoressigsäure* die Schutzgruppen entfernt und das Dipeptid der Totalhydrolyse unterworfen, mit *Hexafluoracetone* umgesetzt und gaschromatographisch untersucht¹⁾. Es erwies sich als frei von *D-allo-Isoleucin*.

2. *N-Benzoyloxycarbonyl-L-isoleucyl-L-phenylalanin*: Die Abspaltung des *tert.-Butylrestes* erfolgte in bekannter Weise mit *Trifluoressigsäure* bei 20° (1 Stde.). Ausb. quantitativ, Schmp. 175–176°, $[\alpha]_{546}^{28}$: -25.5° ($c = 1$, in Methanol).

$C_{23}H_{28}N_2O_5$ (412.5) Ber. C 66.96 H 6.84 N 6.79 Gef. C 66.57 H 6.71 N 6.95

3. *Bestimmung der Racemisierung im L-Isoleucin nach der Synthese von Z-L-Ile-L-Phe-L-Val-OtBu* (vgl. Tab. 1): Die Umsetzungen wurden, wie bei den einzelnen Methoden beschrieben⁹⁾, vorgenommen; sodann wurde, wie ebenfalls bereits angegeben¹⁾, verfahren.

4. *N-Benzoyloxycarbonyl-L-isoleucyl-glycin-tert.-butylester* wurde analog 1. bereitet. Ausb. 62%, Schmp. 122–125° (Essigester/Petroläther).

$C_{20}H_{30}N_2O_5$ (378.5) Ber. C 63.46 H 7.99 N 7.40 Gef. C 63.24 H 7.96 N 7.50

5. *N-Benzoyloxycarbonyl-L-isoleucyl-glycin*: Aus der vorstehenden Verbindung mit *Trifluoressigsäure* bei 20° , Ausb. 90%, 1. Schmp. 105–106°, 2. Schmp. 142–145°.

$C_{16}H_{22}N_2O_5$ (322.4) Ber. C 59.61 H 6.88 N 8.69 Gef. C 59.17 H 7.03 N 8.74

6. *N-Benzoyloxycarbonyl-L-isoleucyl-L-prolin* wurde aus *Z-L-Ile-OH* und *H-L-Pro-OtBu* mittels *DCCI* hergestellt, worauf die *tert.-Butylgruppe* mit *Trifluoressigsäure* (4 Stdn. bei 20°) entfernt wurde. Die Verbindung kristallisierte nicht und wurde daher nicht weiter charakterisiert. Ein Reinheitstest (vgl. Vers. 3) nach der Hydrolyse mit konz. Salzsäure zeigte, daß sie frei war von *D-allo-Isoleucin*.

8) *M. Bergmann* und *L. Zervas*, Ber. dtsch. chem. Ges. **65**, 1192 (1932). *Z-L-Ile-OH* ist bisher nur als Öl beschrieben. Es kristallisierte nach mehreren Wochen, Schmp. (nach Waschen mit Petroläther) 40–45°.

9) *F. Weygand*, *A. Prox* und *W. König*, Chem. Ber. **99**, 1451 (1966), nachstehend.

7. *Racemisierungsuntersuchungen bei der Herstellung von Z-L-Ile-Gly-L-Val-OtBu aus Z-L-Ile-Gly-OH und H-L-Val-OtBu*

a) *Mit DCCI:* Je 0.1 mMol *Z-L-Ile-Gly-OH* und *H-L-Val-OtBu* in 1.5 ccm Methylenchlorid versetzte man bei Raumtemp. mit der Lösung von 0.1 mMol *DCCI* in 1 ccm Methylenchlorid. Nach 26 Stdn. wurde in üblicher Weise aufgearbeitet, der Rückstand totalhydrolysiert und *D-allo-Isoleucin* gaschromatographisch über das entspr. 2.2-Bis-trifluor-methyl-oxazolidon-(5) bestimmt¹⁾. Es ergaben sich ca. 0.5% *D-allo-Isoleucin*.

b) Nach der Methode der gemischten Anhydride, ausgeführt analog 1., ergab sich im *Isoleucin* kein *D-allo-Isoleucin*.

8. *Racemisierungsuntersuchung bei der Herstellung von Z-L-Ile-L-Pro-L-Val-OtBu aus Z-L-Ile-L-Pro-OH und H-L-Val-OtBu:* Die Versuchsausführung war analog 1. Es wurde kein *D-allo-Isoleucin* gefunden.

9. *Racemisierung bei der Umsetzung von Z-L-Ile-L-Phe-OH, Z-L-Ile-Gly-OH und Z-L-Ile-L-Pro-OH mit DCCI oder Acetanhydrid*

a) *Mit DCCI:* 0.1 mMol des jeweiligen *Z-Dipeptids* in 1 ccm THF wurde mit 0.1 mMol *DCCI* in 1 ccm THF versetzt und bei Raumtemp. etwa einen Tag lang stehengelassen.

b) *Mit Acetanhydrid:* 0.1 mMol des jeweiligen *Z-Dipeptids* wurde in 0.5 ccm Eisessig gelöst, mit 0.5 ccm *Acetanhydrid* versetzt und 30 Min. auf 80° erhitzt.

Die Bestimmung des *D-allo-Isoleucins* erfolgte in der angegebenen Weise nach Totalhydrolyse¹⁾, Ergebnisse s. Tab. 2.

[508/65]