

Hans-Dieter Jakubke und Arno Voigt

Über aktivierte Ester, VII¹⁾

Untersuchungen über die peptidchemische Verwendbarkeit von Acylaminosäure-chinolyl-(8)-estern²⁾

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Halle/Saale

(Eingegangen am 7. Februar 1966)

Synthese und Eigenschaften *N*-geschützter Aminosäure- und Peptid-chinolyl-(8)-ester werden beschrieben. Die durch kinetische Messungen ermittelte hohe Aminolyseaktivität dieser neuen aktivierten Ester findet bei der Peptidsynthese unter präparativen Bedingungen ihre Bestätigung. Zur Darstellung von Dipeptidderivaten in Ausbeuten über 90 % genügen Reaktionszeiten von 4 bis 5 Stdn. bei Raumtemperatur. Ein Heptapeptidderivat wird zu 75 % aus einem *N*-geschützten Dipeptid-chinolyl-(8)-ester und einem Pentapeptidester erhalten. Die bei der Aminolyse eliminierte Aktivierungskomponente läßt sich mit $2n$ Säuren quantitativ entfernen. — Bei Peptidsynthesen mit der Chinolyl-(8)-ester-Methode tritt keine Racemisierung auf.

A. Darstellung und Eigenschaften der neuen aktivierten Ester

Zur Synthese der *N*-geschützten Aminosäure-chinolyl-(8)-ester haben sich das DCCI-Verfahren,^{3*)} und die Anhydrid-Methode mit Chlorameisensäure-äthylester⁴⁾ als sehr geeignet erwiesen. Der größte Teil der in guten Ausbeuten erhaltenen Benzyl-oxycarbonyl-aminosäure-chinolyl-(8)-ester kristallisierte sehr gut. Die Phosphoroxychlorid-Methode⁵⁾ lieferte dagegen weniger befriedigende Ergebnisse.

Auch die von anderen Arbeitskreisen^{6, 7)} empfohlene Darstellungsvariante über die Carbonate saurer Phenole ist zur Synthese der Chinolyl-(8)-ester weniger geeignet. Bei der Reaktion von Benzyl-oxycarbonyl-aminosäuren mit Di-[chinolyl-(8)]-carbonat⁸⁾ waren die Ausbeuten nur unter extremen Reaktionsbedingungen akzeptabel.

*) Abkürzung der Aminosäurereste nach E. Brand und J. P. Edsall, *Annu. Rev. Biochem.* **16**, 223 (1947), und einer Empfehlung des Komitees des 5. Europäischen Peptidsymposiums, Oxford 1962.

Acp = 1-Aminocyclopentan-1-carbonsäure, Z = Benzyl-oxycarbonyl-, PHT = Phthaloyl-, NPS = 2-Nitro-benzolsulfonyl-, FOC = Furfuryloxycarbonyl-, OÄt = Äthylester, BZL = Benzyl-, DCCI = Dicyclohexylcarbodiimid, DCHA = Dicyclohexylamin. Für die Chinolyl-(8)-ester wird die Abkürzung -OQ vorgeschlagen.

1) VI. Mittell.: H.-D. Jakubke, *Z. Chem.* **6**, 52 (1966).

2) Vgl. vorläuf. Mittell.: H.-D. Jakubke, *Z. Naturforsch.* **20b**, 273 (1965).

3) J. C. Sheehan und G. P. Hess, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 1067 (1955).

4) Th. Wieland und H. Bernhard, *Liebigs Ann. Chem.* **572**, 190 (1951); J. R. Vaughan jr., *J. Amer. chem. Soc.* **73**, 3547 (1951); R. A. Boissonnas, *Helv. chim. Acta* **34**, 874 (1951).

5) Th. Wieland und B. Heinke, *Liebigs Ann. Chem.* **599**, 70 (1956).

6) Th. Wieland, B. Heinke, K. Vogeler und H. Morimoto, *Liebigs Ann. Chem.* **655**, 189 (1962).

7) T. Glatthard und H. Matter, *Helv. chim. Acta* **46**, 795 (1963).

8) E. J. Corey und R. L. Dawson, *J. Amer. chem. Soc.* **84**, 4901 (1962).

Äußerst elegant gelingt die Darstellung von *N*-[2-Nitro-benzolsulfonyl](NPS)-aminosäure-chinolyl-(8)-estern aus den NPS-Aminosäure-DCHA-Salzen⁹⁾ im „Eintopfverfahren“ mit 8-Hydroxy-chinolin-hydrochlorid nach der DCCI-Methode. Allerdings konnten nicht in allen Fällen kristalline Esterderivate erhalten werden.

Auf Grund des tert. Stickstoffatoms in der leicht zugänglichen Aktivierungskomponente gelingt es, die *N*-geschützten Aminosäure-chinolyl-(8)-ester leicht dünn-schichtchromatographisch durch Besprühen mit Dragendorff-Reagens¹⁰⁾ zu charakterisieren. Die synthetisierten Acylaminosäure-chinolyl-(8)-ester lassen sich auf Kieselgeldünnschichten¹¹⁾ mit Benzol/Methanol (4:1) als einheitliche rotorangefarbene Flecke identifizieren.

Neben dieser exakten Reinheitsprüfung gestattet die Dünnschichtchromatographie darüber hinaus bei Peptidsynthesen den Zeitpunkt der vollständigen Umsetzung zu bestimmen. Außer bei den durch ihre Eigenfarbe ausgezeichneten Acylaminosäure-[4-benzolazo-phenylestern]¹²⁾ ist diese Möglichkeit bei allen anderen zur Peptidsynthese verwendeten aktivierten Arylestern¹³⁾ nicht vorhanden.

Die farblosen, kristallinen Acylaminosäure-chinolyl-(8)-ester sind im Vakuum-exsikkator über Calciumchlorid mehrere Monate haltbar.

Anhand des ölig anfallenden Benzyloxycarbonyl-glycin-chinolyl-(8)-esters konnte gezeigt werden, daß durch Überführung in das *N*-geschützte aktivierte Ester-hydrochlorid auch in solchen Fällen kristalline Derivate erhalten werden können. Diese *N*-acylierten Aminosäure-chinolyl-(8)-ester-hydrochloride lassen sich in Gegenwart äquivalenter Mengen tert. Base mit Aminosäureestern zu Dipeptidderivaten kondensieren.

Zur Darstellung carboxylaktiverter Peptidsequenzen ist die selektive Abspaltung der Aminoschutzgruppen notwendig. In bekannter Weise gelingt die Entacylierung der Benzyloxycarbonyl-aminosäure-chinolyl-(8)-ester mit HBr/Eisessig¹⁴⁾. Die entsprechenden Aminosäure-chinolyl-(8)-ester-dihydrobromide konnten nahezu quantitativ erhalten werden und wurden ohne weitere Reinigung zur Synthese *N*-geschützter aktivierter Dipeptidester eingesetzt. Der NPS-Rest ließ sich nach der von Zervas und Mitarbb.⁹⁾ beschriebenen Technik mit Chlorwasserstoff in Äther entfernen. Die Ausbeuten der am N-Atom ungeschützten aktivierten Ester-dihydrochloride lagen über 95%.

B. Kinetische Bestimmung der Aminolysegeschwindigkeit einiger Acylaminosäure-chinolyl-(8)-ester

Um Rückschlüsse auf die Aminolyseaktivität dieser neuen aktivierten Ester ziehen zu können, wurde zunächst der Aminolyseverlauf kinetisch untersucht. Dazu verfolgten wir die Umsetzung von Benzyloxycarbonyl-aminosäure-chinolyl-(8)-estern mit Benzylamin in Dioxan/Wasser (8:2) bei 25° spektrophotometrisch an Hand des bei der Aminolyse eliminierten 8-Hydroxy-chinolins bei 330 oder 340 nm. Die Verwendung

⁹⁾ L. Zervas, D. Borovas und E. Gazis, J. Amer. chem. Soc. **85**, 3660 (1963).

¹⁰⁾ R. Munier, Bull. chim. biol. **35**, 1225 (1953).

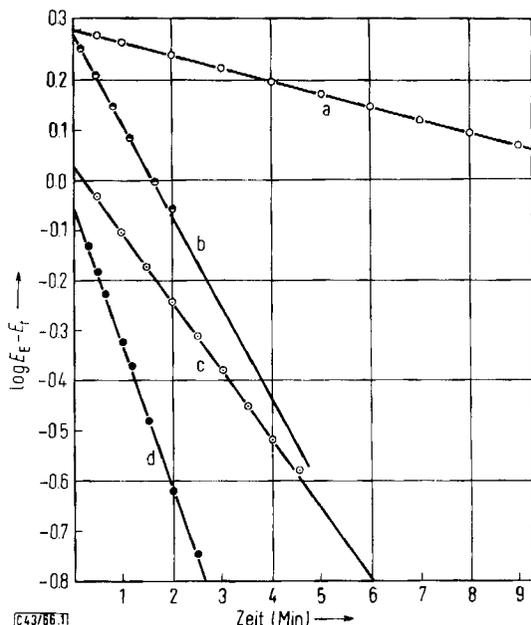
¹¹⁾ Kieselgel-G nach Stahl der Fa. Merck, Darmstadt.

¹²⁾ A. Barth und G. Losse, Z. Naturforsch. **19b**, 264 (1964); A. Barth, J. prakt. Chem. **27** (4), 181 (1965); Liebigs Ann. Chem. **683**, 216 (1965).

¹³⁾ Vgl. Zusammenfassung über aktivierte Ester¹⁾.

¹⁴⁾ D. Ben-Ishai und A. Berger, J. org. Chemistry **17**, 1564 (1952); R. Schwyzer, Helv. chim. Acta **37**, 647 (1954).

eines großen Überschusses an Benzylamin gewährleistete eine Reaktionskinetik „pseudoester Ordnung“. Dadurch wird die Halbwertszeit unabhängig von der Anfangskonzentration des Esters und erlaubte uns, einige Chinolyl-(8)-ester miteinander vergleichen zu können. Durch Auftragen von $\log E_E - E_t$ gegen die Zeit wurde in jedem Falle eine Gerade erhalten (Abbild.).



Aminolyse einiger Benzyloxycarbonyl-aminosäure-chinolyl-(8)-ester ($10^{-3} m$) mit Benzylamin ($10^{-1} m$) in Dioxan/Wasser (8:2) bei 25°

a: Z- β -Ala-OQ

c: Z-DL-Nva-OQ

b: Z-L-Phe-OQ

d: Z-L-Ala-OQ

(E_E = Endextinktion, E_t = Extinktion zur Zeit t)

Nach diesen Ergebnissen sind die Chinolyl-(8)-ester äußerst aminolyseaktive Verbindungen. Aus den ermittelten Halbwertszeiten in Sek. ergibt sich folgende Abstufung in der Reaktivität: Z-L-Ala-OQ (63 Sek.) > Z-L-Phe-OQ (96) > Z-DL-Nva-OQ (128) > Z- β -Ala-OQ (706).

Zur Aufklärung des Mechanismus der Chinolyl-(8)-ester-Aminolyse studierten wir den Einfluß von Protonen, Metall-Ionen und 8-Hydroxy-chinolin auf die Aminolysegeschwindigkeit. Hierfür erschien uns der mit Benzylamin am langsamsten reagierende Benzyloxycarbonyl- β -alanin-chinolyl-(8)-ester am geeignetsten.

Beyermann und Maassen van den Brink¹⁵⁾ konnten zeigen, daß bifunktionelle Katalysatoren, zu denen im Sinne der Definition dieser Autoren auch das 8-Hydroxy-chinolin zählt, die Aminolysegeschwindigkeit von aktivierten Estern deutlich erhöhen. Die Möglichkeit einer katalytischen Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit durch das bei der Aminolyse freigesetzte 8-Hydroxy-chinolin hielten wir daher für wahr-

¹⁵⁾ H. C. Beyermann und W. Maassen van den Brink, Proc. chem. Soc. [London] 1963, 266; Proc. of the 6th Europ. Peptide Symposium in Athen 1963, Pergamon Press, Oxford 1965.

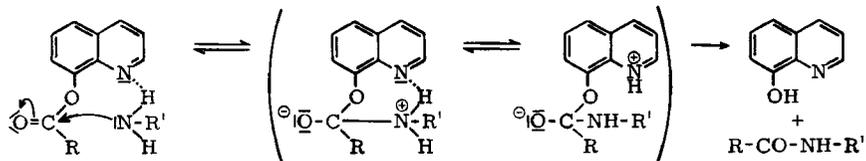
scheinlich. Da sich aber der Aminolyseverlauf durch Zugabe von 50% der theoretisch sich bildenden Menge 8-Hydroxy-chinolin zur Zeit 0 nicht vom normalen Verlauf unterschied, konnte unsere Annahme nicht bestätigt werden.

Auch Kupfer-Ionen und äquimolare Mengen Essigsäure beschleunigen die Umsetzungsgeschwindigkeit des Benzyloxycarbonyl- β -alanin-chinoly(8)-esters mit Benzylamin nicht.

Nach *Audrieth* und Mitarbb.¹⁶⁾ katalysieren geringe Säuremengen die Esteraminolyse. Damit übereinstimmend fand *Schwyzler*¹⁷⁾ eine starke Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit von Cyanmethylestern durch Eisessig. Diese Protonenkatalyse wurde durch andere Arbeitskreise^{12, 18)} bestätigt. *Betts* und *Hammett*¹⁹⁾ beobachteten dagegen keine katalytische Beeinflussung des Verlaufs der Esteraminolyse durch Essigsäure.

Bei der Umsetzung von Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanin- bzw. Benzyloxycarbonyl-L-alanin-chinoly(8)-ester mit äquimolaren Mengen Glycin-äthylester unter präparativen Bedingungen erniedrigten katalytische Mengen Eisessig sogar die Ausbeuten sichtbar. Während nach 4stdg. Reaktion bei Raumtemperatur in Tetrahydrofuran in beiden Fällen 94% Benzyl-oxycarbonyl-dipeptidester isoliert werden konnten, bewirkte die Zugabe von 0.03 ccm Eisessig zu den entsprechenden 0.0025 *m* Reaktionsansätzen Ausbeuteverminderungen um 19%.

Nach den kinetischen Untersuchungen kann die hohe Aminolyseaktivität der Chinoly(8)-ester offenbar nicht allein auf die Positivierung des Carbonyl-Kohlenstoffatoms durch den „Elektronenzug“ des Azasubstituenten zurückgeführt werden. Vielmehr dürfte eine intramolekulare Basenkatalyse dem eigentlichen Additionsschritt vorgelagert sein, wobei durch Reaktion des tert. Ringstickstoffs mit einem Proton der angreifenden Aminokomponente deren Nucleophilie erhöht und dadurch die Bildung des Carbonylladduktes zusätzlich begünstigt wird:



Der weitere Verlauf der Reaktion läßt sich wie in ähnlichen Fällen als Additions-Eliminierungs-Mechanismus²⁰⁾ interpretieren.

C. Zur Frage der Racemisierung

Neben der schon lange bekannten Azid-Methode²¹⁾, deren Nachteile in den vielen beschriebenen Nebenreaktionen²²⁾ zu suchen sind, wurde kürzlich mit dem *N*-Hydroxy-piperidyl-ester-Verfahren^{18, 23)} eine weitere racemisierungsfreie Peptid-synthese-Variante gefunden.

¹⁶⁾ L. L. *Fellinger* und L. F. *Audrieth*, J. Amer. chem. Soc. **60**, 579 (1938); L. F. *Audrieth* und J. *Kleinberg*, J. org. Chemistry **3**, 312 (1938); P. K. *Glaseo*, J. *Kleinberg* und L. F. *Audrieth*, J. Amer. chem. Soc. **61**, 2387 (1939).

¹⁷⁾ R. *Schwyzler*, M. *Feurer* und B. *Iselin*, Helv. chim. Acta **38**, 83 (1955).

¹⁸⁾ S. M. *Beaumont*, B. O. *Handford*, J. H. *Jones* und G. T. *Young*, Chemical Communications **1965**, 53.

¹⁹⁾ R. L. *Betts* und L. P. *Hammett*, J. Amer. chem. Soc. **59**, 1568 (1937).

²⁰⁾ M. L. *Bender*, Chem. Reviews **60**, 53 (1960).

²¹⁾ Th. *Curtius*, Ber. dtsch. chem. Ges. **35**, 3226 (1902).

²²⁾ E. *Schnabel*, Liebigs Ann. Chem. **659**, 168 (1962).

²³⁾ F. *Weygand* und W. *König*, Z. Naturforsch. **20b**, 710 (1965).

Zum Nachweis möglicher Racemisierung haben wir zunächst den Anderson-Callahan-Test²⁴⁾ ausgewählt. Nach der Goodman-Methode²⁵⁾ synthetisierten wir Z-Gly-L-Phe-OQ, der als Rohprodukt mit freiem Glycin-äthylester kondensiert wurde. Die fraktionierte Kristallisation des rohen Anderson-Peptids in 2-proz. äthanol. Lösung bei 0° ergab kein Racemat. Nach mehrfachem Einengen der Lösung wurden 83% des L-Antipoden isoliert.

Des weiteren untersuchten wir die optische Stabilität des *N*-Benzoyl-D-leucin-chinoly(8)-esters in Gegenwart molarer Mengen Triäthylamin. Das aus Benzoylchlorid und D-Leucin-chinoly(8)-ester-dihydrobromid dargestellte Benzoylderivat zeigte in Chloroform nach 4 Tagen keinen Drehungsabfall. Auf Grund der hohen Aminolyseaktivität der Chinoly(8)-ester — zu präparativen Kondensationen genügen 4—20 Stdn. — erscheint die optische Stabilität dieser neuen aktivierten Ester ausreichend zu sein, um einen racemisierungsfreien Verlauf der Peptidsynthese zu garantieren.

Mit Hilfe des empfindlichsten Racemisierungstests, des gaschromatographischen Verfahrens²⁶⁾, fand Weygand²⁷⁾ bei der Verknüpfung von Z-L-Leu-L-Phe-OQ mit L-Valin-tert.-butylester keine Racemisierung. Damit dürfte die Chinoly(8)-ester-Methode neben den oben erwähnten beiden Verfahren den strengen Anforderungen an Racemisierungssicherheit genügen.

D. Peptidsynthesen

Als Kupplungskomponenten für die carboxylaktiven Verbindungen dienten freie Aminosäureester bzw. Aminosäure- oder Peptidester-hydrobromide unter Zusatz äquiv. Mengen tert. Amins als Säureacceptor. Die Verwendung von Salzen der zu acylierenden Komponente ist, wie anhand der Darstellung von Z-DL-Phe-Gly-OH aus Z-DL-Phe-OQ und äquimolaren Mengen Glycin und Natriumhydrogencarbonat in Wasser gezeigt wurde, prinzipiell möglich. Bei einigen Dipeptidester-Synthesen wurden Reaktionszeiten von 20 Stdn. bei Raumtemperatur angegeben. Nach neueren Untersuchungen genügen jedoch bereits 4—5 Stdn. zur Erzielung maximaler Ausbeuten.

Nach diesen guten Ergebnissen versuchten wir, einen *N*-geschützten Dipeptid-chinoly(8)-ester mit einem Tripeptid- bzw. Pentapeptid-ester zu kondensieren. Die

BZL

Umsetzung von Z-L-Cys-L-Ala-OQ in Dimethylformamid mit äquimolaren Mengen

BZL

Gly-L-Phe-Gly-OÄt·HBr und Triäthylamin bzw. Gly-L-Cys-L-Ala-Gly-Gly-OÄt·HBr und der äquiv. Menge tert. Base 20 bzw. 18 Stdn. bei Raumtemperatur ergab das Pentapeptidderivat in 80- und das Heptapeptidderivat in 75-proz. Ausbeute. Somit ist die Chinoly(8)-ester-Methode in besonderen Fällen auch zur Fragmentkondensation geeignet.

²⁴⁾ G. W. Anderson und F. M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. **80**, 2902 (1958); G. W. Anderson und R. W. Young, ebenda **74**, 5307 (1952).

²⁵⁾ M. Goodman und K. C. Stueben, J. Amer. chem. Soc. **81**, 3980 (1959).

²⁶⁾ F. Weygand, A. Prox, L. Schmidhammer und W. König, Angew. Chem. **75**, 282 (1963); Angew. Chem. internat. Edit. **2**, 183 (1963).

²⁷⁾ F. Weygand, Privatmitteilung.

Das bei der Aminolyse eliminierte 8-Hydroxy-chinolin läßt sich mit $2n$ Säuren restlos entfernen. Eine quantitative Abtrennung der freigesetzten Aktivierungskomponente ist, im Gegensatz hierzu, bei vielen zur Peptidsynthese verwendeten aktivierten Estern, wie z. B. bei den Nitrophenylestern, nicht gegeben. In Tab. 1 sind einige der synthetisierten Peptidderivate zusammengestellt.

Tab. 1. Nach der Chinolyl-(8)-ester-Methode dargestellte Peptidderivate

Synthetisiertes Peptid	Acylkomponente	Aminokomponente	Ausb. *) (%)
Z-L-Phe-Gly-OÄt	Z-L-Phe-OQ	GlyOÄt	96 (87)
Z-DL-Phe-Gly-OÄt	Z-DL-Phe-OQ	GlyOÄt	97
Z-DL-Phe-Gly-OH	Z-DL-Phe-OQ	GlyONa	84
NPS-L-Phe-Gly-OÄt	NPS-L-Phe-OQ	GlyOÄt	97
Z-L-Ala-Gly-OÄt	Z-L-Ala-OQ	GlyOÄt	94
Z-DL-Ala-Gly-OÄt	Z-DL-Ala-OQ	GlyOÄt	97
Z-β-Ala-Gly-OÄt	Z-β-Ala-OQ	GlyOÄt	91 (92)
Z-Acp-Gly-OÄt	Z-Acp-OQ	GlyOÄt	90
Z-Gly-L-Phe-Gly-OÄt	Z-Gly-L-Phe-OQ	GlyOÄt	89
BZL	BZL		
Z-L-Cys-L-Ala-Gly- L-Phe-Gly-OÄt	Z-L-Cys-L-Ala-OQ	Gly-L-Phe- Gly-OÄt·HBr	80
BZL	BZL	BZL	
Z-L-Cys-L-Ala-Gly- BZL	Z-L-Cys-L-Ala-OQ	Gly-L-Cys- L-Ala-Gly- Gly-OÄt·HBr	75
L-Cys-L-Ala-Gly- Gly-OÄt			

*) Ausb. () nach Isttdg. Erhitzen unter Rückfluß.

Herrn Prof. Dr. H. Schubert und Herrn Prof. Dr. W. Langenbeck danken wir für ihr förderndes Interesse an dieser Arbeit. Besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. F. Weygand für die Ausführung des gaschromatographischen Racemisierungstests sowie Herrn Prof. Dr. J. Rudinger für anregende Diskussionen.

Für umsichtige experimentelle Mitarbeit sei Frau H. Mittelbach herzlich gedankt.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden auf dem Mikro-Heiztisch „Boetius“ bestimmt (korr.). Die Drehwert-Messungen erfolgten in einem 2-Dezimeter-Rohr mit einer Ablesegenauigkeit von $\pm 0.01^\circ$.

1. Allgemeine Darstellung der Acylaminosäure-chinolyl-(8)-ester in Tab. 2

Methode A mit Chlorameisensäure-äthylester: In einem mit KPG-Rührer und Tropftrichter versehenen Dreihalskolben wird zu 1 Äquiv. Acylaminosäure in absol. Tetrahydrofuran (30 ccm für 0.01 Mol) und 1 Äquiv. absol. Triäthylamin bei -15° unter starkem Rühren 1 Äquiv. Chlorameisensäure-äthylester getropft und dann der Ansatz noch 10 Min. bei -15° belassen. Nach Zugabe einer Lösung von 1 Äquiv. 8-Hydroxy-chinolin in Tetrahydrofuran rührt man 1 Stde. bei -15° und 1 Stde. bei Raumtemperatur. Danach werden 20 ccm Wasser hinzugefügt und das Tetrahydrofuran i. Vak. abdestilliert. Die Lösung des Rückstandes in Essigester wird nacheinander mit Wasser, gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung, Wasser, $0.5n$ H_2SO_4 und Wasser gründlich gewaschen. Nach Trocknen mit Natriumsulfat wird der Essigester i. Vak. abdestilliert und das Rohprodukt aus Essigester bzw. Äther/Petroläther umgefällt.

Tab. 2. Dargestellte Acylaminosäure-chinolyl-(8)-ester

-chinolyl-(8)-ester	Methode (% Ausb.)	Schmp. (Essigester/ Petroläther)	Summenformel (Mol.-Gew.)	Analyse			
				C	H	N	
Z-L-Ala-	A (83)	102—103°	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₄ (350.4)	Ber.	68.55	5.18	8.00
	B (77)			Gef.	68.46	5.16	8.05
Z-D-Ala-	A (74)	101—102° *)	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₄ (350.4)	Ber.	68.55	5.18	8.00
	B (77)			Gef.	68.58	5.34	7.98
Z-DL-Ala-	A (80)	95—95.5°	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₄ (350.4)	Ber.	68.55	5.18	8.00
	B (88.5)			Gef.	68.55	4.89	8.09
Z-β-Ala-	A (73)	83—84.5°	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₄ (350.4)	Ber.	68.55	5.18	8.00
				Gef.	68.28	5.26	8.09
PHT-β-Ala-	A (83)	155.5—156.5°	C ₂₀ H ₁₄ N ₂ O ₄ (346.3)	Ber.	69.36	4.08	8.09
				Gef.	69.22	4.21	7.96
PHT-Gly-	A (89)	166—167°	C ₁₉ H ₁₂ N ₂ O ₄ (332.3)	Ber.	68.67	3.64	8.43
				Gef.	68.57	4.02	8.48
FOC-DL-Ala- **)	A (74)	124—124.5°	C ₁₈ H ₁₇ N ₂ O ₅ (341.4)	Ber.	63.33	5.02	8.21
				Gef.	63.23	5.18	8.55
Z-L-Phe-	A (73)	139.5—140°	C ₂₆ H ₂₂ N ₂ O ₄ (426.5)	Ber.	73.22	5.20	6.57
	B (77)			Gef.	73.12	5.38	6.75
Z-DL-Phe-	A (75)	117—118°	C ₂₆ H ₂₂ N ₂ O ₄ (426.5)	Ber.	73.22	5.20	6.57
	B (77)			Gef.	73.26	5.35	6.65
Z-L-Met-	A (76)	87—88° *)	C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₄ S (410.5)	Ber.	64.36	5.40	6.83
				Gef.	64.51	5.61	6.78
Z-DL-Met-	A (74)	76—77° *)	C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₄ S (410.5)	Ber.	64.36	5.40	6.83
				Gef.	64.14	5.71	6.99
Z-DL-Nva-	A (84)	70—72°	C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₄ (378.4)	Ber.	69.82	5.86	7.41
	B (69)			Gef.	70.02	6.15	7.75
Z-DL-homo-Cys-	A (80)	102—104°	C ₂₈ H ₂₆ N ₂ O ₄ S (486.6)	Ber.	69.11	5.39	5.76
				Gef.	69.42	5.26	5.89
Z-L-Cys-	A (78)	102.5—103.5° *)	C ₂₇ H ₂₄ N ₂ O ₄ S (472.6)	Ber.	68.62	5.12	5.93
				Gef.	68.53	5.22	5.61
Z-DL-Val-	A (67.5)	70—72° *)	C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₄ (378.4)	Ber.	69.82	5.86	7.41
	B (94)			Gef.	69.63	5.69	6.98
Z-L-Glu-α-O-BZL-γ-	A (86)	98—100°	C ₂₉ H ₂₆ N ₂ O ₆ (498.5)	Ber.	69.87	5.26	5.62
				Gef.	70.05	5.38	5.76
Z-DL-Ile-	B (76)	74—75° *)	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₄ (392.5)	Ber.	70.39	6.16	7.14
				Gef.	70.07	6.04	7.17
1-[Z-Amino]-cyclo- pentan-carbonsäure-(1)-	A (75)	145.5—147°	C ₂₃ H ₂₂ N ₂ O ₄ (390.4)	Ber.	70.77	5.68	7.18
				Gef.	71.13	5.70	7.14
Z-D-Leu-	A (74)	Öl	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₄ (392.5)	Ber.	70.39	6.16	7.14
				Gef.	70.44	5.89	7.21
Z-Gly- ***)	A (82)	Öl	C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₄ (336.4)	Ber.	67.84	4.80	8.33
				Gef.	68.31	5.01	8.19

*) Umkristallisiert aus absol. Äther/Petroläther.

***) FOC-DL-Ala-OH wurde freundlicherweise von Herrn Dr. H. Jeschkeit zur Verfügung gestellt.

*** Z-Gly-OQ wurde in absol. Äther gelöst und durch Einleiten von trockenem Chlorwasserstoff in das N-geschützte aktivierte Esterhydrochlorid übergeführt. Ausb. 90%, Schmp. 130—131°.

C₁₉H₁₇N₂O₄Cl (372.8) Ber. C 61.21 H 4.60 N 7.52 Gef. C 61.10 H 4.83 N 7.71

Methode B mit DCCI: 30 mMol Acylaminosäure und 33 mMol 8-Hydroxy-chinolin in 100 ccm Essigester werden bei -10° mit 6.19 g (30 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach 3 stdg. Stehenlassen bei -10° und 12 Stdn. bei Raumtemperatur wird nach Zugabe einiger Tropfen 50-proz. Essigsäure vom Harnstoff abfiltriert, die Lösung i. Vak. eingedampft und, wie bei Methode A beschrieben, aufgearbeitet (Tab. 2 und 3).

Tab. 3. Optische Drehung $[\alpha]_D^t$ einiger Chinolyl-(8)-ester aus Tab. 2 in Dimethylformamid

Verbindung	$[\alpha]$	t	c
Z-L-Ala-OQ	-67.9°	26°	1.01
Z-D-Ala-OQ	$+67.6^\circ$	24°	1.009
Z-L-Phe-OQ	-70°	25°	2.002
Z-L-Met-OQ	-44.9°	24°	0.952
BZL			
Z-L-Cys-OQ	-52.2°	22°	2.004

2. Allgemeine Darstellung der Aminosäure-chinolyl-(8)-ester-dihydrobromide

Die Benzoyloxycarbonyl-aminosäure-chinolyl-(8)-ester werden unter Feuchtigkeitsausschluß mit einer 36-proz. Lösung von HBr in Eisessig (ca. 10ccm auf 10 mMol) in der üblichen Weise¹⁴⁾ entacyliert. Nach 1 Stde. versetzt man mit absol. Äther, wobei die Dihydrobromide kristallin ausfallen, die auf der Fritte sorgfältig mit Äther gewaschen und ohne zusätzliche Reinigung weiter verwendet werden.

L-Phenylalanin-chinolyl-(8)-ester-dihydrobromid: Ausb. 99%.

$C_{18}H_{18}N_2O_2 \cdot 2Br$ (454.2) Ber. N 6.17 Gef. N 6.23

D-Leucin-chinolyl-(8)-ester-dihydrobromid: Ausb. 97%.

$C_{15}H_{20}N_2O_2 \cdot 2Br$ (420.2) Ber. N 6.67 Gef. N 6.51

L-Alanin-chinolyl-(8)-ester-dihydrobromid: Ausb. 98%.

$C_{12}H_{14}N_2O_2 \cdot 2Br$ (378.1) Ber. N 7.41 Gef. N 7.08

3. Darstellung der NPS-Aminosäure-chinolyl-(8)-ester: 10 mMol NPS-Aminosäure-DCHA-Salz und 1.82 g 8-Hydroxy-chinolin-hydrochlorid in 100 ccm trockenem Chloroform werden bei Raumtemperatur 4 Stdn. gerührt. Die Mischung wird auf 0° abgekühlt, mit 2.24 g Dicyclohexylcarbodiimid versetzt und anschließend 3 Stdn. bei 0° gerührt. Nach 12stdg. Stehenlassen gibt man einige Tropfen 50-proz. Essigsäure hinzu und filtriert. Das Chloroform wird i. Vak. abdestilliert, der Rückstand in Essigester aufgenommen und nacheinander mit Wasser, 0.5n H_2SO_4 , Wasser, gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gründlich gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird die Lösung i. Vak. eingengt und mit Petroläther überschichtet.

NPS-L-Alanin-chinolyl-(8)-ester: Ausb. 82%, Schmp. 131–132.5°.

$C_{18}H_{15}N_3O_4S$ (369.4) Ber. C 58.53 H 4.09 N 11.38 Gef. C 58.11 H 4.19 N 11.38

NPS-L-Phenylalanin-chinolyl-(8)-ester: Ausb. 85%, Schmp. 138.5–140°.

$C_{24}H_{19}N_3O_4S$ (445.5) Ber. C 64.71 H 4.30 N 9.43 Gef. C 65.15 H 4.70 N 9.60

NPS-DL-Phenylalanin-chinolyl-(8)-ester: Ausb. 83%, Schmp. 174–177°.

$C_{24}H_{19}N_3O_4S$ (445.5) Ber. C 64.71 H 4.30 N 9.43 Gef. C 64.92 H 4.14 N 9.70

NPS-l-Amino-cyclopentan-carbonsäure-(1)-chinolyl-(8)-ester: Ausb. 75%, Schmp. 135–136°.

$C_{21}H_{19}N_3O_4S$ (409.5) Ber. C 61.59 H 4.68 N 10.50 Gef. C 61.51 H 4.58 N 10.60

4. L-Alanin-chinolyl-(8)-ester-dihydrochlorid: 0.5 g NPS-L-Alanin-chinolyl-(8)-ester in 10 ccm Essigester werden mit 5 ccm HCl-haltigem Äther (2.5n) 1 Stde. bei Raumtemperatur

stehengelassen. Nach Absaugen wird sorgfältig mit Äther gewaschen. Ausb. 0.36 g (91%), Schmp. 159–161° (Zers.).

$C_{12}H_{14}N_2O_2 \cdot 2Cl$ (289.2) Ber. C 49.83 H 4.88 N 9.69 Gef. C 49.34 H 5.06 N 9.71

5. *N-Benzoyl-D-leucin-chinolyl-(8)-ester*: 2.1 g *D-Leucin-chinolyl-(8)-ester-dihydrobromid* werden in 30 ccm Essigester suspendiert, mit 0.6 ccm *Benzoylchlorid* versetzt und anschließend eine Lösung von 2.65 g *Natriumcarbonat* in 15 ccm Wasser hinzugegeben. Man rührt 2 Stdn. bei Raumtemperatur und wäscht die organische Phase nacheinander mit Wasser, 0.5 n H_2SO_4 und Wasser. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird die Essigesterlösung i. Vak. eingeengt und mit Petroläther überschichtet. Ausb. 1.39 g (78%), Schmp. 151–152°, $[\alpha]_D^{25}$: +62.3° ($c = 1.004$, in Chloroform).

$C_{22}H_{22}N_2O_3$ (362.4) Ber. C 72.90 H 6.12 N 7.73 Gef. C 72.64 H 5.88 N 8.13

6. *N-Benzoyloxycarbonyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-alanin-chinolyl-(8)-ester*

Zu 8.5 g *N-Benzoyloxycarbonyl-S-benzyl-L-cystein* in 100 ccm absol. Tetrahydrofuran und 3.4 ccm *Triäthylamin* werden bei -15° unter Rühren 2.75 g *Chlorameisensäure-äthylester* getropft. Man läßt 10 Min. bei -15° stehen und gibt dann 6.8 ccm Triäthylamin und unter starkem Rühren 9.14 g *L-Alanin-chinolyl-(8)-ester-dihydrobromid* in Tetrahydrofuran/Wasser schnell hinzu. Man rührt noch 1 Stde. bei -15° und 3 Stdn. bei Raumtemperatur. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels i. Vak. wird der feste Rückstand mit Wasser, gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung, Wasser, 0.5 n H_2SO_4 und Wasser digeriert. Das Rohprodukt wird aus Tetrahydrofuran/Petroläther umgefällt. Ausb. 9.8 g (74%), Schmp. 132–133°, $[\alpha]_D^{25}$: -65.4° ($c = 2.018$, in Dimethylformamid).

$C_{30}H_{29}N_3O_5S$ (543.7) Ber. C 66.27 H 5.38 N 7.73 Gef. C 66.60 H 5.60 N 7.82

7. Allgemeine Darstellung der *N*-geschützten Peptidderivate in Tab. 4

Zu einer Lösung von 1 Äquiv. *N*-geschütztem *Aminosäure-chinolyl-(8)-ester* in Essigester (50 ccm für 0.01 Mol) gibt man 1 Äquiv. *Aminosäureester* und rührt bei Raumtemperatur.

Tab. 4. Reaktionszeiten und analytische Charakterisierung der nach 7. dargestellten Peptidderivate (Ausbeuten siehe Tab. 1)

Verbindung	Schmp.	Rk.-Zeit (Stdn.)
Z-L-Phe-Gly-OÄt ^{a)}	113–114°	4*)
Z-DL-Phe-Gly-OÄt	96–98° (Lit. ²⁸⁾ ; 97.5–99°)	20
Z-L-Ala-Gly-OÄt	100–101° (Lit. ²⁹⁾ ; 100°)	4
Z-DL-Ala-Gly-OÄt	78° (Lit. ⁵⁾ ; 77–79°)	20
Z-β-Ala-Gly-OÄt	100° (Lit. ³⁰⁾ ; 101–102°)	20*)
NPS-L-Phe-Gly-OÄt ^{b)}	122–123°	16
Z-Acp-Gly-OÄt ^{c)}	123.5–124.5°	12

*) Die Darstellung des Z-Dipeptidesters gelingt auch durch 1stdg. Erhitzen unter Rückfluß.

a) $[\alpha]_D^{25}$: -16.3° ($c = 2$, in Äthanol) (Lit.²⁸); $[\alpha]_D^{25}$: -16.6° , $c = 2$ (in Äthanol), Schmp. 110–113°.

b) $[\alpha]_D^{25}$: $+26.2^\circ$ ($c = 2$, in Dimethylformamid) (Lit.⁹⁾; $[\alpha]_D^{25}$: $+26.5^\circ$, $c = 2$ (in Dimethylformamid), Schmp. 121–122°.

c) $C_{18}H_{24}N_2O_5$ (348.4) Ber. C 62.05 H 6.94 N 8.04 Gef. C 62.48 H 7.20 N 8.32

28) R. W. Young, K. H. Wood, R. J. Joyce und G. W. Anderson, J. Amer. chem. Soc. **78**, 2126 (1956).

29) B. F. Erlanger und E. Brand, J. Amer. chem. Soc. **73**, 3508 (1951).

30) O. Süs, Liebigs Ann. Chem. **572**, 96 (1961).

Nach den angegebenen Reaktionszeiten wird die Essigesterlösung nacheinander mit Wasser, 2*n* HCl, Wasser, gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gründlich gewaschen, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, i. Vak. zur Trockne eingeengt und die *Peptidderivate* aus Essigester/Petroläther umkristallisiert (s. Tab. 4).

8. *Benzyloxycarbonyl-DL-phenylalanyl-glycin*: Zu 2.13 g *Benzyloxycarbonyl-DL-phenylalanyl-chinolyl-(8)-ester* in 40 ccm Tetrahydrofuran gibt man eine Lösung von 0.375 g *Glycin* und 0.42 g *Natriumhydrogencarbonat* in 10 ccm Wasser und rührt 4 Stdn. bei Raumtemperatur. Das Tetrahydrofuran wird i. Vak. abgedampft, die wäbr. Phase angesäuert, das Dipeptid in Essigester aufgenommen und die Essigesterlösung sorgfältig mit Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Beim Ansäuern mit Salzsäure kristallisiert das Dipeptidderivat. Ausb. 1.5 g (84%), Schmp. 157—158° (Lit.³¹⁾: 157—158°).

9. *Benzyloxycarbonyl-glycyl-glycin-äthylester*: 1.86 g *Benzyloxycarbonyl-glycin-chinolyl-(8)-ester-hydrochlorid* in 30 ccm Tetrahydrofuran werden mit 0.7 ccm *Triäthylamin* und anschließend mit 0.54 ccm *Glycin-äthylester* versetzt. Man erhitzt 1 Stde. unter Rückfluß und arbeitet, wie unter 7. beschrieben, auf. Aus Essigester/Petroläther Ausb. 1.2 g (80%), Schmp. 80—81° (Lit.³²⁾: 82°).

10. *N-Benzyloxycarbonyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-alanyl-glycyl-L-phenylalanyl-glycin-äthylester*: Zu einer Lösung von 0.98 g *Z-L-Cys(BZL)-L-Ala-OQ* in 30 ccm Dimethylformamid gibt man 0.7 g *Glycyl-L-phenylalanyl-glycin-äthylester-hydrobromid* und 0.25 ccm *Triäthylamin*, rührt 20 Stdn. bei Raumtemperatur und verdampft anschließend das Lösungsmittel i. Vak. Der Rückstand wird mit Essigester verrieben, danach mit Petroläther überschichtet und das kristalline Rohprodukt auf der Fritte sorgfältig mit Wasser, gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung, Wasser, 2*n* HCl und Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Phosphorpentoxid aus Tetrahydrofuran/Petroläther Ausb. 1 g (80%), Schmp. 182—184°, $[\alpha]_D^{20}$: -11.3° (*c* = 1.016, in Dimethylformamid).

$C_{35}H_{43}N_5O_8S$ (693.8) Ber. C 60.59 H 6.25 N 10.10 Gef. C 60.42 H 6.38 N 10.55

11. *N-Benzyloxycarbonyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-alanyl-glycyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-alanyl-glycyl-glycin-äthylester*: 0.41 g *Z-L-Cys(BZL)-L-Ala-OQ* in 30 ccm Dimethylformamid werden mit 0.4 g *Gly-L-Cys(BZL)-L-Ala-Gly-Gly-OÄ-Hydrobromid* und 0.16 ccm *Triäthylamin* umgesetzt. Nach 18 stdg. Rühren bei Raumtemperatur wird wie unter 10. aufgearbeitet. Aus Dimethylformamid/Petroläther Ausb. 0.498 g (75%), Schmp. 229.5—230.5°, $[\alpha]_D^{20}$: -19.1° (*c* = 1.008, in Dimethylformamid).

$C_{42}H_{53}N_7O_{10}S_2$ (880.1) Ber. C 57.32 H 6.07 N 11.14 Gef. C 56.81 H 5.61 N 11.43

12. *Anderson-Callahan-Test*²⁴⁾

Benzyloxycarbonyl-glycyl-L-phenylalanyl-chinolyl-(8)-ester: 2.09 g *Benzyloxycarbonyl-glycin* und 1.4 ccm *Triäthylamin* in 50 ccm absol. Tetrahydrofuran werden bei -15° mit 1.09 g *Chlorameisensäure-äthylester* zum gemischten Anhydrid umgesetzt. Nach 10 Min. werden weitere 2.8 ccm *Triäthylamin* und 4.57 g *L-Phenylalanyl-chinolyl-(8)-ester-dihydrobromid* in Tetrahydrofuran/Wasser hinzugegeben. Die Aufarbeitung ergibt 3.95 g (81%) gelbes Öl, das ohne zusätzliche Reinigung weiter verarbeitet wird.

Benzyloxycarbonyl-glycyl-L-phenylalanyl-glycin-äthylester: 3.95 g des vorstehenden *N-geschützten Dipeptid-chinolyesters* werden in 50 ccm Tetrahydrofuran mit 0.84 g *Glycin-äthylester* 20 Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Abdampfen i. Vak. wird in Essigester aufgenommen, mit Wasser, 2*n* HCl, Wasser, gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Abdampfen i. Vak.

³¹⁾ K. Schlögl, F. Wessely und E. Wawersich, Mh. Chem. **85**, 957 (1954).

³²⁾ S. Goldschmidt und M. Wick, Liebigs Ann. Chem. **575**, 217 (1952).

verreibt man solange mit Äther, bis Kristallisation eintritt. Ausb. 3.2 g (89%), Schmp. 115–118°.

Fractionierte Kristallisation: Aus der 2-proz. Lösung von 2 g des *Anderson-Peptids* in Äthanol kristallisiert bei 2-tägigem Stehenlassen bei 0° kein Racemat. Nach mehrmaligem Einengen i. Vak., Stehenlassen bei 0° und Übersichten mit Äther werden insgesamt 1.66 g (83%) des *L-Antipoden* isoliert. Schmp. 118–119.5°, $[\alpha]_D^{25}$: -11.4° ($c = 2.02$, in Äthanol) (Lit.³³⁾: Schmp. 116.5–119.5°, $[\alpha]_D^{25}$: -11.5° , $c = 2$, in Äthanol).

13. *Kinetische Messungen:* Das verwendete Dioxan wird nach einer besonderen Vorschrift³⁴⁾ gereinigt, während man Benzylamin i. Vak. destilliert und über Kaliumhydroxid aufbewahrt.

Bei der durch Auswertung der UV-Spektren gewählten Wellenlänge (330 oder 340 nm) wird die Änderung der Extinktion des bei der Aminolyse freigesetzten 8-Hydroxy-chinolins mit einem Universal-Spektralphotometer der Fa. VEB Carl Zeiß Jena in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt.

Stammlösungen bekannter Konzentration des aktivierten Esters und Benzylamins in Dioxan/Wasser (8:2) bringt man im Thermostaten zur Temperaturkonstanz (25°). Zur Zeit $t = 0$ wird die Reaktion durch Mischen aliquoter Mengen Benzyloxycarbonyl-aminosäure-chinolyl-(8)-ester und Benzylamin in einer temperierten 1-cm-Quarzküvette gestartet und die Änderung der Extinktion gegen Dioxan/Wasser (8:2) als Null-Lösung zeitlich verglichen.

³³⁾ G. W. Anderson und F. M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. **80**, 2902 (1958).

³⁴⁾ K. Hess und H. Frahm, Ber. dtsh. chem. Ges. **71**, 2627 (1938).

[43/66]