

Hans-Dieter Jakubke, Arno Voigt † und Siegmur Burkhardt

Über aktivierte Ester, IX¹⁾

Untersuchungen über den Mechanismus der racemisierungsfreien Peptidsynthese mit Acylaminosäure-chinolyl-(8)-estern

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Halle/S.

(Eingegangen am 4. Februar 1967)

Durch vergleichende kinetische Untersuchungen der Aminolyseaktivität verschiedener Acylaminosäure-chinolyl-ester wird der Beweis für einen Reaktionsmechanismus erbracht, durch den die ungewöhnlich hohe Geschwindigkeit und zugleich der racemisierungsfreie Verlauf der Chinolyl-(8)-ester-Aminolyse erklärt werden kann.

Bedingt durch notwendige Reaktionen an einer mit dem asymmetrischen Zentrum verknüpften funktionellen Gruppe, ist fast jeder Schritt bei der Peptidsynthese mit einem Racemisierungsrisiko verbunden.

Nach umfangreichen Untersuchungen von Weygand und Mitarbb.²⁾ mit dem vom gleichen Arbeitskreis entwickelten gaschromatographischen Verfahren³⁾ zur Prüfung auf Racemisierung, ist die von uns beschriebene Chinolyl-(8)-ester-Methode^{4,5)}, nach der Curtius'schen Azid-Methode⁶⁾ und dem von Young in die Peptidchemie eingeführten *N*-Hydroxy-piperidyl-ester-Verfahren⁷⁾, die dritte Synthesevariante, die die strengen Anforderungen an Racemisierungssicherheit erfüllt.

Die durch kinetische Messungen⁵⁾ ermittelte hohe Aminolyseaktivität der Acylaminosäure-chinolyl-(8)-ester läßt sich nicht mit dem üblichen, auch für die Esteraminolyse gültigen, B_{Ac}2-Mechanismus erklären. Da starke Aktivierung nach mechanistischen Studien von Young⁸⁾ auch die intramolekulare, reversible Bildung eines Azlactons fördert, ist der racemisierungsfreie Verlauf der Peptidsynthese über Chinolyl-(8)-ester nach dem oben erwähnten Mechanismus nicht zu interpretieren. Dagegen spricht auch der hohe pK_a-Wert (9.89 bei 20°)⁹⁾ der Aktivierungskomponente.

1) VIII. Mitteil.: H.-D. Jakubke und A. Voigt, Chem. Ber. 99, 2944 (1966).

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

3) F. Weygand, A. Prox, L. Schmidhammer und W. König, Angew. Chem. 75, 282 (1963).

4) H.-D. Jakubke, Z. Naturforsch. 20b, 273 (1965).

5) H.-D. Jakubke und A. Voigt, Chem. Ber. 99, 2419 (1966).

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

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

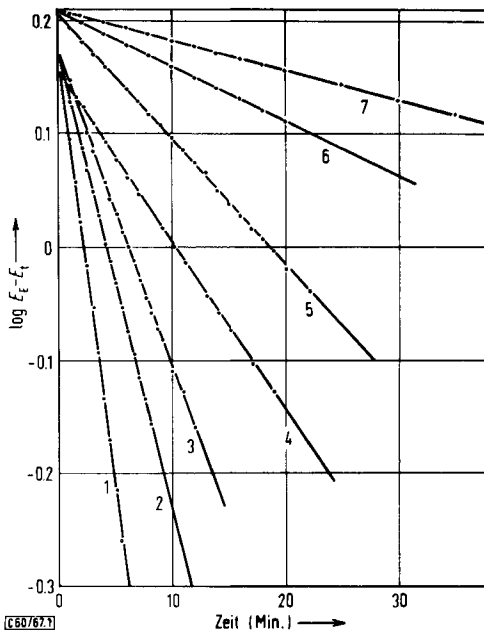
8) M. W. Williams und G. T. Young, J. chem. Soc. [London] 1964, 3701.

9) A. Albert und J. N. Phillips, J. chem. Soc. [London] 1956, 1294.

Zum Beweis des von uns vorgeschlagenen besonderen Mechanismus für die Chinolyl-(8)-ester-Aminolyse⁵⁾ synthetisierten wir nach der Anhydrid-¹⁰⁾ und DCCI*-Methode¹¹⁾ eine Reihe von Benzyloxycarbonyl-aminosäure-chinolyl-(3)- und Benzyloxycarbonyl-aminosäure-chinolyl-(6)-ester und bestimmten die Aminolysegeschwindigkeit nach der in einer vorangegangenen Mitteilung⁵⁾ angewandten Methodik. Die Auswahl dieser beiden stellungsisomeren Chinolyl-ester erfolgte aus zwei Gründen:

1. Von allen 8 möglichen Monohydroxy-chinolinen besitzt das 3-Hydroxy-chinolin den niedrigsten pK_a -Wert (8.06)⁹⁾. Mit Ausnahme des fast vollständig in der tautomeren Amidform vorliegenden 2- bzw. 4-Hydroxy-chinolins, ist das 6-Hydroxy-chinolin mit einem pK_a -Wert⁹⁾ von 8.88 repräsentativ für die verbleibenden Derivate.

2. An Hand von Modellen läßt sich leicht nachweisen, daß die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücken-Bindung allein für das Carbonyladdukt der



Abbild. 1. Aminolyse einiger Benzyloxycarbonyl-aminosäure-chinolyl-(3)- und Benzyloxycarbonyl-aminosäure-chinolyl-(6)-ester ($10^{-3}m$) mit Benzylamin ($10^{-1}m$) in Dioxan/Wasser (8 : 2) bei 25°

- | | | |
|-----------------|-------------------------|-----------------|
| 1: Z-GlyOQ(3) | 3: Z-L-PheOQ(3) | 5: Z-GlyOQ(6) |
| 2: Z-L-AlaOQ(3) | 4: Z- β -AlaOQ(3) | 6: Z-L-AlaOQ(6) |
| | 7: Z-DL-PheOQ(6) | |

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

* Abkürzung der Aminosäuresymbole nach *E. Brand* und *J. P. Edsall*, *Annu. Rev. Biochem.* **16**, 223 (1947), und einer Empfehlung des Komitees des 5. Europäischen Peptidsymposiums, Oxford 1962. Z = Benzyloxycarbonyl-, DCCI = Dicyclohexylcarbodiimid, -OQ(8) = Chinolyl-(8)-ester, -OQ(3) = Chinolyl-(3)-ester, -OQ(6) = Chinolyl-(6)-ester, s-RNA = lösliche Ribonucleinsäure.

¹⁰⁾ *Th. Wieland* und *H. Bernhard*, *Liebigs Ann. Chem.* **572**, 190 (1951).

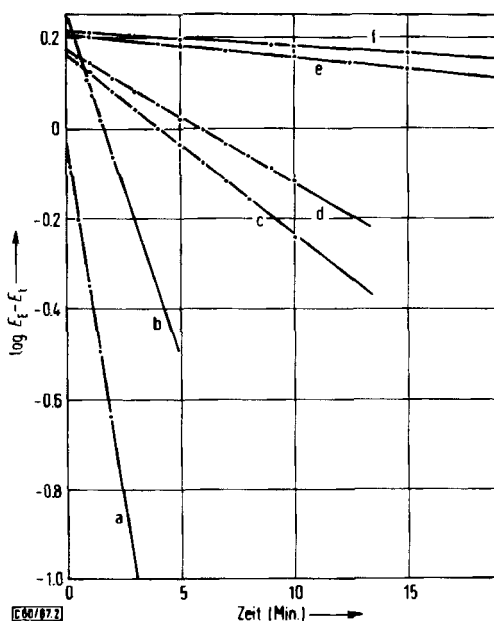
¹¹⁾ *J. C. Sheehan* und *G. P. Hess*, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 1067 (1955).

Chinolyl-(8)-ester möglich ist. Dagegen gelingt eine derartige räumliche Fixierung mit den entsprechenden Zwischenverbindungen der neu dargestellten Ester nicht.

Die Eigenschaften der erhaltenen Verbindungen entsprechen weitgehend denen der Acylaminosäure-chinolyl-(8)-ester. Im Gegensatz zum Benzylloxycarbonyl-glycin-chinolyl-(8)-ester gelang es, den analogen 3- und 6-Ester kristallin zu erhalten. Da die dargestellten Verbindungen lediglich als Modellsubstanzen für kinetische Untersuchungen nützlich sind, wurden keine systematischen Versuche zur Erzielung maximaler Ausbeuten bei den Synthesen durchgeführt. Zur dünn-schichtchromatographischen Charakterisierung bewährte sich auch hier Kieselgel-G und das Laufmittelsystem Benzol/Methanol (4 : 1). Die Erkennung erfolgte mit Dragendorff-Reagens¹²⁾ oder durch Fluoreszenz im UV.

Durch Umsetzung der Benzylloxycarbonyl-aminosäure-chinolyl-ester ($10^{-3} m$) mit Benzylamin ($10^{-1} m$) bei 25° in Dioxan/Wasser (8 : 2) wurde die Bedingung für eine Reaktionskinetik „pseudoerster Ordnung“ erfüllt, so daß die gefundenen Ergebnisse mit denen der Chinolyl-(8)-ester⁵⁾ vergleichbar sind. Der Aminolyse-Verlauf konnte spektrophotometrisch mittels des bei der Reaktion freigesetzten 3- bzw. 6-Hydroxy-chinolins bei 340 nm verfolgt werden (Abbild. 1).

Abgesehen von der erwarteten unterschiedlichen Reaktivität der beiden untersuchten Estertypen, ist die Abstufung in der Aminolyseaktivität innerhalb der beiden



Abbild. 2. Aminolyseverlauf einiger Benzylloxycarbonyl-aminosäure-ester ($10^{-3} m$) des 8-, 3- und 6-Hydroxy-chinolins mit Benzylamin ($10^{-1} m$) in Dioxan/Wasser (8:2) bei 25°

a: Z-L-AlaOQ(8) c: Z-L-AlaOQ(3) e: Z-L-AlaOQ(6)
 b: Z-L-PheOQ(8) d: Z-L-PheOQ(3) f: Z-DL-PheOQ(6)

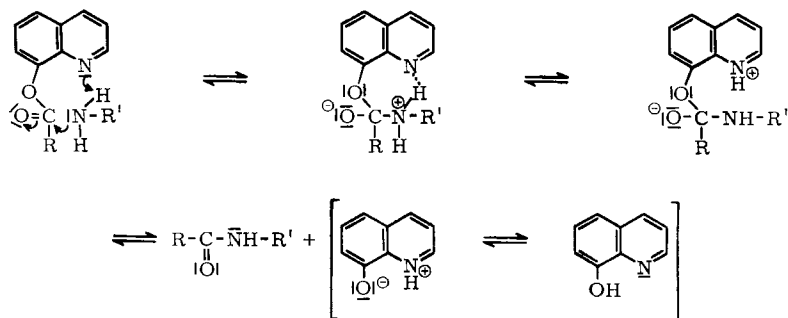
¹²⁾ R. Munier, Bull. chim. biol. **35**, 1225 (1953).

Reihen analog und steht in Übereinstimmung mit den Resultaten der unsubstituierten und halogensubstituierten Acylaminosäure-chinolyl-(8)-ester. Die Ursachen hierfür sind bedingt durch die verschiedene Substitution am α -C-Atom der einzelnen Aminosäurederivate.

Diskussion der Ergebnisse

Die unterschiedliche Reaktivität der Chinolyl-(3)- und Chinolyl-(6)-ester läßt sich auf die Differenz in den pK_a -Werten der entsprechenden Aktivierungskomponenten zurückführen. Die Aminolyse dieser Ester kann durch den $B_{Ac}2$ -Mechanismus interpretiert werden, da das bei der Reaktion eliminierte 3-Hydroxy-chinolin, im Gegensatz zum 6-Hydroxy-chinolin, die konjugierte Base einer stärkeren Säure ist. Auf Grund des um mehr als eine Einheit höheren pK_a -Wertes des 8-Hydroxy-chinolins sollte man bei dieser Betrachtungsweise folgende Reaktivitätsabstufung erwarten: Chinolyl-(3)-ester > Chinolyl-(6)-ester > Chinolyl-(8)-ester.

Aus der Abbild. 2 kann man aber entnehmen, daß die Benzoyloxycarbonyl-aminosäure-chinolyl-(8)-ester mit Abstand die größte Aminolyseaktivität besitzen. Diese Tatsachen sind ein Beweis für den von uns vorgeschlagenen Mechanismus⁵⁾:



Durch eine spezifische nucleophile Katalyse des tert. Stickstoffatoms in der 8-Stellung des Chinolinringes wird im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt die Addition der Aminokomponente an das Carboxyl-C-Atom beschleunigt und das resultierende Carbonyladdukt durch eine intramolekulare Wasserstoffbrücken-Bindung stabilisiert. In den analogen Zwischenverbindungen der Chinolyl-(3)- und Chinolyl-(6)-ester-Aminolyse sind derartige Wechselwirkungen aus sterischen Gründen nicht möglich.

Für die Peptidsynthese über *N*-Hydroxy-piperidyl-ester hatte Young¹³⁾ bereits vor uns einen Reaktionsmechanismus postuliert, der sich lediglich durch die Ringgröße des durch die Wasserstoffbrücke fixierten cyclischen Carbonyladdukts unterscheidet. Die Ergebnisse der hier aufgezeigten kinetischen Studien stellen zweifelsohne auch einen Beweis für die Richtigkeit des Youngschen Mechanismus dar, zumal die gegebenen besonderen Strukturverhältnisse der *N*-Hydroxy-piperidyl-ester derartige vergleichende Untersuchungen ausschließen.

¹³⁾ B. O. Handford, J. H. Jones und G. T. Young, J. chem. Soc. [London] 1965, 6814.

In Übereinstimmung mit den Vorstellungen von *Young*^{14,*}) erklärt der hier bewiesene spezifische Mechanismus der Chinolyl-(8)-ester-Aminolyse zwangsläufig den racemisierungsfreien Verlauf der Reaktion, da durch diesen Mechanismus lediglich der intermolekulare nucleophile Angriff der Aminokomponente auf das Carboxyl-C-Atom beschleunigt wird. Die zur Azlactonbildung führende intramolekulare Konkurrenzreaktion des Carbonyl-O-Atoms der Amidgruppierung mit dem aktivierten Carboxyl-C-Atom bleibt, wegen des fehlenden Protons zur Ausbildung der Wasserstoffbrücken-Bindung, von dieser Wirkung unbeeinflusst.

So konnte *Young*¹⁴⁾ eindeutig nachweisen, daß eine Lösung von Benzoyl-L-leucin-chinolyl-(8)-ester in Chloroform nach Zugabe von Triäthylamin nicht die für ein Azlacton charakteristische IR-Carbonylbande bei 1830/cm zeigt.

Folgendermaßen lassen sich die Ursachen für die racemisierungsfreie und gleichzeitig schnell verlaufende Peptidsynthese über Chinolyl-(8)-ester zusammenfassen:

1. Die zur Vermeidung der racemisierungsbedingenden intramolekularen Azlactonbildung erforderliche schwache Aktivierung der Carboxylgruppierung ist auf Grund des hohen pK_a -Wertes der Aktivierungskomponenten gegeben.

2. Das sich bei Annäherung der nucleophilen Aminokomponente an das Carboxyl-C-Atom bildende Carbonyladdukt stabilisiert sich durch Ausbildung einer Wasserstoffbrücke mit dem in sterisch günstiger Stellung befindlichen tert. Chinolin-N-Atoms, das gleichzeitig als Protonenacceptor fungiert und so insgesamt die intermolekulare Kupplungsreaktion beschleunigt.

Verallgemeinert könnten diese Befunde zum besseren Verständnis des hohen Gruppenübertragungspotentials der bei der Proteinbiosynthese auftretenden Aminoacyl-s-RNA beitragen. Nach umfangreichen Versuchen mit Modellschubstanzen^{15,16)} erwies sich der Einfluß der makromolekularen s-RNA-Struktur auf die Reaktivität der Estergruppierung im eigenen terminalen Adenosinteil als unbedeutend; dagegen üben vor allem die *cis*-Hydroxylgruppe und Sauerstoffbrücke des Riboseanteils sowie der tert. Purinstickstoff einen Aktivierungseffekt aus.

Bei der stufenweisen Verknüpfung der determinierten Aminoacyl-s-RNA zum Di-, Tri- und Polypeptid unter sukzessiver Eliminierung der s-RNA der jeweils vorletzten Aminosäure erscheint der oben angeführte, von der spezifischen Wirkung des tert. Ringstickstoffs getragene Mechanismus für die Erklärung der hohen Aminolyseaktivität zusätzlich diskutabel. Modellmäßig läßt sich zeigen, daß im entsprechenden Carbonyladdukt einer mit der 3'-Hydroxylgruppe¹⁷⁾ des terminalen Adenosins veresterten Aminosäure eine Wasserstoffbrücken-Bindung zum tert. Stickstoff-Atom in 3-Stellung des Adenins optimal möglich ist.

Wir danken Herrn Prof. Dr. H. Schubert und Herrn Prof. Dr. W. Langenbeck für die großzügige Förderung dieser Arbeit. Besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. J. Rudinger für viele anregende Diskussionen.

Für sorgfältige experimentelle Mitarbeit sei Frau H. Mittelbach gedankt.

*) Herrn Dr. G. T. Young sind wir für die freundliche Übersendung einer Kopie seines Vortragsmanuskriptes zu großem Dank verpflichtet.

14) G. T. Young, *Proceed. 8th European Peptide Symp.*, Noordwijk (1966), North Holland Publishing Co., im Druck.

15) Th. Wieland, H. Merz und G. Pfeiderer, *Chem. Ber.* **93**, 1816 (1960).

16) H. G. Zachau, *Chem. Ber.* **93**, 1822 (1960); H. G. Zachau und W. Karau, ebenda **93**, 1830 (1960).

17) J. Sonnenbichler, H. Feldmann und H. G. Zachau, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **334**, 283 (1963).

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden auf dem Mikro-Heiztisch „Boetius“ bestimmt und sind nicht korrigiert. In einem 2-Dezimeter-Rohr mit einer Ablesegenauigkeit von ± 0.01 erfolgten die Drehwertsbestimmungen.

Allgemeine Darstellungsmethode der Benzyloxycarbonyl-aminosäure-chinoly-ester

Methode A: 10 mMol *Benzyloxycarbonyl-aminosäure* in 40 ccm absol. Tetrahydrofuran werden mit 1.4 ccm (10 mMol) Triäthylamin versetzt und die Mischung auf -15° abgekühlt. Unter starkem Rühren tropft man 1.09 g (10 mMol) *Chlorameisensäure-äthylester* hinzu. Nach 10 Min. werden 1.45 g (10 mMol) 3- bzw. 6-*Hydroxy-chinolin*, gelöst in 10 ccm Tetrahydrofuran, zugefügt und der Reaktionsansatz 30 Min. bei -15° und 1 Stde. bei Raumtemp. gerührt. Zur Aufarbeitung gibt man 20 ccm Wasser hinzu und destilliert das Tetrahydrofuran i. Vak. ab. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen und nacheinander mit Wasser, gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung, Wasser, 0.5 *n* H₂SO₄ und Wasser gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase mit Natriumsulfat dampft man den Essigester i. Vak. ab und kristallisiert die Rohprodukte aus Essigester bzw. Äther/Petroläther um.

Methode B: 10 mMol *Benzyloxycarbonyl-aminosäure* und 11 mMol 6-*Hydroxy-chinolin* in 50 ccm Essigester werden bei -15° mit 2.09 g (10 mMol) *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt. Nach 2stdg. Stehenlassen bei -15° und 18 Stdn. bei Raumtemp. setzt man einige Tropfen 50-proz. Essigsäure zu und saugt nach 1 Stde. den Dicyclohexylharnstoff ab. Die weitere Aufarbeitung folgt der Methode A.

Tab. 1. Dargestellte Benzyloxycarbonyl-aminosäure-chinoly-(3)-ester

-chinoly- (3)-ester	Methode (% Ausb.)	Schmp.	Summenformel (Mol.-Gew.)	Analyse		
				C	H	N
Z-Gly-	A (70)	115–115.5°	C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₄ (336.4)	Ber. 67.84 Gef. 67.62	4.80 5.03	8.33 8.60
Z-Ala- ^{a)}	A (84)	93–94°	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₄ (350.4)	Ber. 68.55 Gef. 68.60	5.18 5.29	8.00 8.06
Z-L-Phe- ^{b)}	A (63)	107.5–108.5°	C ₂₆ H ₂₂ N ₂ O ₄ (426.5)	Ber. 73.22 Gef. 73.09	5.20 5.28	6.57 6.89
Z-DL-Phe-	A (85)	102–104°	C ₂₆ H ₂₂ N ₂ O ₄ (426.5)	Ber. 73.22 Gef. 73.02	5.20 5.24	6.57 6.69
Z-β-Ala-	A (65)	73–76°	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₄ (350.4)	Ber. 68.55 Gef. 68.22	5.18 5.69	8.00 8.04

^{a)} $[\alpha]_D^{26}$: -39.5° ($c = 2$, in Dimethylformamid). ^{b)} $[\alpha]_D^{27}$: -15.9° ($c = 2$, in Dimethylformamid).

Tab. 2. Dargestellte Benzyloxycarbonyl-aminosäure-chinoly-(6)-ester

-chinoly- (6)-ester	Methode (% Ausb.)	Schmp.	Summenformel (Mol.-Gew.)	Analyse		
				C	H	N
Z-Gly-	A (84) B (65)	94–96°	C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₄ (336.4)	Ber. 67.84 Gef. 67.70	4.80 4.70	8.33 8.21
Z-L-Ala- ^{a)}	A (90) B (65)	96–98°	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₄ (350.4)	Ber. 68.55 Gef. 68.85	5.18 5.15	8.00 8.03
Z-DL-Phe-	A (68) B (72)	91–92.5°	C ₂₆ H ₂₂ N ₂ O ₄ (426.5)	Ber. 73.22 Gef. 73.20	5.20 5.27	6.57 6.69

^{a)} $[\alpha]_D^{20}$: -38.2° ($c = 0.508$, in Dimethylformamid).