

Wolfgang König und Rolf Geiger

Racemisierung bei Peptidsynthesen

Aus den Farbwerken Hoechst AG, vormals Meister Lucius & Brüning,
Frankfurt a. M.-Höchst

(Eingegangen am 2. Februar 1970)

Durch Anwendung mehrerer gaschromatographischer Racemisierungstests wurde gefunden, daß bei der DCCD-Methode¹⁾ aus einer Reihe von *N*-Hydroxyverbindungen als Zusatz zum DCCD das 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin die Racemisierung am wirkungsvollsten senkt. Auch eine racemisierungsfreie Voraktivierung ist mit dieser Verbindung möglich. Bei der Herstellung von *N*-Acyl-peptid-[*N*-hydroxy-succinimidestern] nach der DCCD-Methode wirkt sich ein Zusatz schwacher tert. Basen günstig auf Ausbeute und Racemisierung aus.

Racemization in Peptide Syntheses

Various gaschromatographic racemization tests indicate, that 3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazine as additive to DCCD decreases racemization in the DCCD-method to a minimum, compared with a series of *N*-hydroxy-compounds. It is also possible to prepare the intermediate activated esters without racemization. Addition of weak tertiary bases has a favourable effect on the yield and racemization in the preparation of *N*-acylpeptide-*N*-hydroxysuccinimide esters by the DCCD-method.

Das häufig zur Peptidsynthese angewandte Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD)¹⁾ bewirkt bei der Verknüpfung von *N*-Acyl-peptiden mit Aminosäure- oder Peptidestern nach den Untersuchungen zahlreicher Autoren stets Racemisierung²⁻⁷⁾. Durch Zusatz von *N*-Hydroxyverbindungen wie *N*-Hydroxy-succinimid (HOSu)⁸⁻¹²⁾, *N*-Hydroxy-phthalimid^{10, 13)} oder 1-Hydroxy-benzotriazol (HOBt)¹⁴⁾ konnte die Racemisierung stark gesenkt werden.

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

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

3) N. A. Smart, G. T. Young und M. W. Williams, J. chem. Soc. [London] **1960**, 3902.

4) M. W. Williams und G. T. Young, J. chem. Soc. [London] **1963**, 881.

5) L. Heard und G. T. Young, J. chem. Soc. [London] **1963**, 5807.

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

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

8) E. Wünsch und F. Drees, Chem. Ber. **99**, 110 (1966).

9) F. Weygand, D. Hoffmann und E. Wünsch, Z. Naturforsch. **21b**, 426 (1966).

10) J. E. Zimmerman und G. W. Anderson, J. Amer. chem. Soc. **89**, 7151 (1967).

11) F. Weygand, D. Hoffmann und A. Prox, Z. Naturforsch. **23b**, 279 (1968).

12) N. Izumiya und M. Muraoka, J. Amer. chem. Soc. **91**, 2391 (1969).

13) D. Hoffmann, Dissertation, Techn. Hochschule München 1968.

14) W. König und R. Geiger, Chem. Ber. **103**, 788 (1970).

Wie wir fanden, kann aber auch *N*-Hydroxy-succinimid oder 1-Hydroxy-benzotriazol die Racemisierung in bestimmten Fällen nicht vollständig unterbinden. Setzt man nämlich analog dem *Weygandschen* Racemisierungstest¹¹⁾ Tfa-Pro-Val-OH mit H-Pro-O^tBu in Dimethylformamid mit DCCD/HOSu oder DCCD/HOBt um, so trat auch hier Racemisierung ein (Tab. 2)¹⁵⁾. Dieser Befund bewog uns, nach weiteren Zusätzen zu suchen, die auch in ungünstigen Fällen die Racemisierung verhindern.

Zur Ermittlung der Racemisierung wurde zunächst der bereits beschriebene modifizierte gaschromatographische Racemisierungstest¹⁴⁾ nach *Weygand* und Mitarbb.⁷⁾ herangezogen, in dem Boc-Leu-Phe-OH mit H-Val-O^tBu verknüpft wird (Tab. 1). Als Lösungsmittel wurde in der Regel Dimethylformamid verwendet, das die Racemisierung fördert und somit den Test empfindlicher gestaltet.

Durch Zusatz von Pentachlorphenol, 4-Nitro-2-methoxy-phenol und 2-Mercapto-1-methyl-benzimidazol wurde die Racemisierung zum Teil beträchtlich verstärkt. Die Nucleophilie dieser Verbindungen ist offensichtlich schwächer als die von H-Val-O^tBu. Da jedoch die nucleophile Kraft von H-Val-O^tBu durch Salzbildung mit den Phenolen geschwächt ist, wird die Tendenz zur Azlactonbildung und damit die Racemisierung verstärkt.

Im Gegensatz zu 1-Hydroxy-benzotriazol bewirkte auch ein Zusatz von 4-Hydroxy-1.2.3-benzotriazin¹⁶⁾ keine Senkung der Racemisierung. Damit erschienen im Hinblick auf eine racemisierungsfreie Peptidsynthese nur die stark nucleophilen *N*-Hydroxyverbindungen interessant. Tatsächlich wurde die Racemisierung durch 1-Hydroxy-2-oxo-indolin¹⁷⁾ merklich auf 3.2% *D*-Verbindung zurückgedrängt. Unter 1% fiel die Racemisierung bei der Verwendung von 3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazin¹⁸⁾ oder 3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-chinazolin¹⁸⁾ als Zusatz. Die beiden letztgenannten Verbindungen sowie deren kernsubstituierte Halogenverbindungen bewährten sich in diesem Racemisierungstest ebenso gut wie *N*-Hydroxy-succinimid⁹⁾ oder 1-Hydroxy-benzotriazol¹⁴⁾. Die in der 2-Stellung substituierten Chinazolin-derivate¹⁸⁾ ergaben jedoch wieder etwas Racemisierung.

Wie schon eingangs erwähnt, lieferte die Anwendung der DCCD/HOSu- und der DCCD/HOBt-Methode bei der Synthese von Tfa-Pro-Val-Pro-O^tBu aus Tfa-Pro-Val-OH und H-Pro-O^tBu in Dimethylformamid kein sterisch einheitliches Produkt¹⁵⁾. *Weygand* und Mitarbb.¹¹⁾ fanden bei diesem Test (mit H-Pro-OMe anstelle von H-Pro-O^tBu) unter Anwendung der DCCD/HOSu-Methode zwar kaum Racemisierung, doch verwendeten sie als Lösungsmittel Methylenchlorid, das die Racemisierung nicht in dem Maße begünstigt wie beispielsweise Dimethylformamid. Bei der Synthese von Tfa-Val-Val-OMe mittels DCCD fanden sie z. B. in Methylenchlorid einen Racemisierungsgrad von 7.2%, während bei gleichen Reaktionsbedingungen in Dimethylformamid der Racemisierungsgrad 43.4% betrug⁶⁾. In Tab. 2 sind die Ergebnisse der Umsetzung von Tfa-Pro-Val-OH mit HCl·H-Pro-O^tBu und

¹⁵⁾ *W. König* und *R. Geiger*, 10. Europ. Peptidsymposium, Abano-Terme, Italien (1969).

¹⁶⁾ *A. Weddige* und *H. Finger*, J. prakt. Chem. [2] **35**, 262 (1887).

¹⁷⁾ *W. B. Wright jr.* und *K. H. Collins*, J. Amer. chem. Soc. **78**, 221 (1956).

¹⁸⁾ *D. Harrison* und *A. C. B. Smith*, J. chem. Soc. [London] **1960**, 2157.

Tab. 1. Racemisierung bei der DCCD-Methode unter Zusatz verschiedener Phenole und *N*-Hydroxyverbindungen (Synthese von Boc-Leu-Phe-Val-O^tBu aus Boc-Leu-Phe-OH und HCl·H-Val-O^tBu + *N*-Äthyl-morpholin, Reaktionszeit: 1 Stde. bei 0° und 1 Stde. bei Raumtemp.)

Äquivv.	Zusatz	Lösungs- mittel	% D-Phe-L-Val
	ohne	THF	8.1
	ohne	DMF	14.3
	ohne	DMSO	14.9
	ohne	Pyridin	19.2
2	Pentachlorphenol	THF	10.0
2	Pentachlorphenol	DMF	27.0
1	4-Nitro-2-methoxy-phenol	DMF	21.7
1	2-Mercapto-1-methyl-benzimidazol	DMF	21.4
1	4-Hydroxy-1.2.3-benzotriazin ¹⁶⁾	DMF	14.0
2	Benzotriazol	DMF	12.4
2	<i>N</i> -Hydroxy-succinimid	DMF	< 1.0
1	1-Hydroxy-benzotriazol	DMF	< 1.0 ¹⁴⁾
1	1-Hydroxy-2-phenyl-benzimidazol ¹⁹⁾	DMF	13.4
2	1-Hydroxy-2-phenyl-benzimidazol ¹⁹⁾	DMF	15.2
1	1-Hydroxy-2-oxo-indolin ¹⁷⁾	DMF	3.2
2	1-Hydroxy-2-oxo-indolin ¹⁷⁾	DMF	4.2
1	6-Chlor-1-hydroxy-2-oxo-indolin ¹⁷⁾	DMF	7.3
2	6-Chlor-1-hydroxy-2-oxo-indolin ¹⁷⁾	DMF	4.6
1	3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-chinazolin ¹⁸⁾	DMF	< 1.0
2	3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-chinazolin ¹⁸⁾	DMF	< 1.0
1	6-Brom-3-hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-chinazolin	DMF	< 1.0
1	3-Hydroxy-4-oxo-2-methyl-3.4-dihydro-chinazolin ¹⁸⁾	DMF	5.1
1	6-Brom-3-hydroxy-4-oxo-2-methyl-3.4-dihydro-chinazolin	DMF	2.75
1	3-Hydroxy-4-oxo-2-phenyl-3.4-dihydro-chinazolin ¹⁸⁾	DMF	4.6
1	3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazin ¹⁸⁾	DMF	< 1.0
1	3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazin ¹⁸⁾	THF	< 1.0
1	3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazin ¹⁸⁾	CH ₂ Cl ₂	< 1.0
1	3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazin ¹⁸⁾	DMA	< 1.0
1	3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazin ¹⁸⁾	DMSO	1.15
1	3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazin ¹⁸⁾	Pyridin	1.5
1	6-Brom-3-hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazin	DMF	< 1.0

Tab. 2. Racemisierung bei der DCCD-Methode unter Zusatz verschiedener *N*-Hydroxyverbindungen (Synthese von Tfa-Pro-Val-Pro-O^tBu aus Tfa-Pro-Val-OH und HCl·H-Pro-O^tBu + *N*-Äthyl-morpholin in DMF als Lösungsmittel, Reaktionszeit: 1 Stde. bei 0° und 1 Stde. bei Raumtemp.)

Äquivv.	Zusatz	% L-D-L-Verb.
	ohne	38.0
1	1-Hydroxy-benzotriazol	3.4
1	<i>N</i> -Hydroxy-succinimid	17.4
2	<i>N</i> -Hydroxy-succinimid	17.2
1	3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-chinazolin ¹⁸⁾	5.1
1	6-Brom-3-hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-chinazolin	17.1
1	3-Hydroxy-4-oxo-2-methyl-3.4-dihydro-chinazolin ¹⁸⁾	39.5
1	6-Brom-3-hydroxy-4-oxo-2-methyl-3.4-dihydro-chinazolin	38.3
1	3-Hydroxy-4-oxo-2-phenyl-3.4-dihydro-chinazolin ¹⁸⁾	42.1
1	3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazin ¹⁸⁾	< 1.0
1	6-Brom-3-hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazin	3.0
1	4-Hydroxy-1.2.3-benzotriazin ¹⁶⁾	42.2

¹⁹⁾ G. W. Stacy, B. V. Ettlting und A. J. Papa, J. org. Chemistry **29**, 1537 (1964).

N-Äthyl-morpholin mittels DCCD zusammengefaßt. Ohne Zusatz wurden 38% *L-D-L*-Verbindung gefunden. 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin bewährte sich von allen Zusätzen am besten. Es senkte die Racemisierung unter 1% *L-D-L*-Verbindung.

Bei Verwendung von destilliertem *H-Pro-O^tBu* (Tab. 3) fanden wir ohne Zusatz von *N*-Hydroxyverbindungen 67% *L-D-L*-Verbindung¹⁵⁾. Auch bei Zusatz von einem Mol *N*-Hydroxy-succinimid oder 1-Hydroxy-benzotriazol war die Racemisierung größer als bei Verwendung von *HCl·H-Pro-O^tBu* und *N*-Äthyl-morpholin. Dieses Ergebnis ist wohl nur so zu deuten, daß das stark basische *H-Pro-O^tBu* ($pK = 7.8^{20)}$ die Racemisierung beschleunigt, während bei Verwendung von *HCl·H-Pro-O^tBu* und dem schwächer basischen *N*-Äthyl-morpholin ($pK = 6.9^{20)}$ die Basizität und damit die Racemisierung gesenkt wird.

Tab. 3. Racemisierung bei der DCCD-Methode unter Zusatz verschiedener *N*-Hydroxyverbindungen (Synthese von *Tfa-Pro-Val-Pro-O^tBu* aus *Tfa-Pro-Val-OH* und *H-Pro-O^tBu* in DMF als Lösungsmittel, Reaktionszeit: 4 Std. bei 0° und über Nacht bei Raumtemp.)

Äquivv.	Zusatz	% <i>L-D-L</i> -Verb.
	ohne	67.0
1	<i>N</i> -Hydroxy-succinimid	28.0
1.2	<i>N</i> -Hydroxy-succinimid	21.0
2	<i>N</i> -Hydroxy-succinimid	15.0
1	1-Hydroxy-benzotriazol	6.0
2	1-Hydroxy-benzotriazol	5.9
1	3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-chinazolin	4.0
1	3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin	<1.0
2	3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin	<1.0

Um weitere Informationen über diesen extrem empfindlichen *Pro-Val-Pro-Racemisierungstest* zu bekommen, ersetzten wir den Trifluoracetyl-Rest durch die Benzyl-oxycarbonyl-Gruppe. Wir setzten also *Z-Pro-Val-OH* mit *H-Pro-O^tBu* um, hydrierten den Benzyl-oxycarbonyl-Rest ab und trifluoracetylierten das Tripeptid zu *Tfa-Pro-Val-Pro-O^tBu*. Diese Verbindung wurde durch Trifluoressigsäure- und anschließende Diazomethan-Behandlung in den für den gaschromatographischen Test geeigneten Ester *Tfa-Pro-Val-Pro-OME* übergeführt. Auch hier war (Tabb. 4 und 5) die Racemisierung mit destilliertem *H-Pro-O^tBu* größer als bei Verwendung des Salzes *HCl·H-Pro-O^tBu* und *N*-Äthyl-morpholin. Von einigen Ausnahmen abgesehen, scheint der Benzyl-oxycarbonyl-Rest die Racemisierung noch mehr zu begünstigen als der Trifluoracetyl-Rest. 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin war auch hier die einzige Verbindung, die die Racemisierung auf etwa 1% *L-D-L*-Verbindung senkte.

Die Erklärung für diese ungewöhnlich starke Racemisierung im *Pro-Val-Pro-Test* ist wohl nicht allein in sterischen Verhältnissen zu suchen. *Determann* und *Mitarbb.*²¹⁾ untersuchten die Racemisierung gemischter Anhydride von *N-Acyl-phenyl-*

²⁰⁾ Bestimmt aus der Näherungsformel $pH - pK \approx \lg \alpha / 1 - \alpha$ für $\alpha \approx 0.5$ in 0.0667 *m* Methanol/Wasser-Lösung (2:1) bei 25°.

²¹⁾ *H. Determann, J. Heuer, P. Pfaeder und M.-L. Reinartz*, Liebigs Ann. Chem. **694**, 190 (1966).

alanin in Abhängigkeit vom Acylrest und fanden mit steigender Nucleophilie des Sauerstoffs in den Carbonsäureamiden eine zunehmende Racemisierung. Der Sauerstoff des Prolyl-Restes ist durch den doppelten +I-Effekt des Pyrrolidinrings sehr nucleophil und zur Azlactonbildung besonders geeignet. Eine Rolle spielt sicher auch die sperrige Isopropylgruppe des Valins, die das gesamte Molekül in eine für die Azlactonbildung günstige Lage drängt.

Tab. 4. Racemisierung bei der DCCD-Methode unter Zusatz verschiedener *N*-Hydroxyverbindungen (Synthese von *Z*-Pro-Val-Pro-O^tBu aus *Z*-Pro-Val-OH und HCl·H-Pro-O^tBu + *N*-Äthyl-morpholin in DMF als Lösungsmittel, Reaktionszeit: 1 Stde. bei 0° und 1 Stde. bei Raumtemp.)

Äquiv.	Zusatz	% L-D-L-Verb.
	ohne	23.3
2	<i>N</i> -Hydroxy-succinimid	18.9
1	1-Hydroxy-benzotriazol	8.4
1	3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-chinazolin	8.4
1	3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazin	1.3

Tab. 5. Racemisierung bei der DCCD-Methode unter Zusatz verschiedener *N*-Hydroxyverbindungen (Synthese von *Z*-Pro-Val-Pro-O^tBu aus *Z*-Pro-Val-OH und H-Pro-O^tBu in DMF als Lösungsmittel, Reaktionszeit: 4 Stdn. bei 0° und über Nacht bei Raumtemp.)

Äquiv.	Zusatz	% L-D-L-Verb.
	ohne	48.0
2	<i>N</i> -Hydroxy-succinimid	46.0
1	1-Hydroxy-benzotriazol	9.0
2	1-Hydroxy-benzotriazol	18.0
2	1-Hydroxy-5-methyl-benzotriazol ¹⁴⁾	10.0

Um einer Racemisierung bei der DCCD-Methode wirkungsvoll zu begegnen, muß erstens die Basizität gesenkt und zweitens ein stark nucleophiles Reagens zugesetzt werden, das den Wettlauf mit der Azlactonbildung gewinnt bzw. bereits gebildete, noch optisch voll aktive Azlactone ohne Racemisierung öffnen kann. Das aktivierte Produkt muß durch Aminolyse rasch spaltbar sein. In hervorragender Weise bewährte sich 3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazin. An zweiter Stelle standen 1-Hydroxy-benzotriazol, 3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-chinazolin sowie einige durch Brom im Benzolkern substituierte Derivate des 3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazins und 3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-chinazolins, an dritter Stelle *N*-Hydroxy-succinimid.

Wie man aus den *pK*-Werten in Tab. 6 erkennt, sind 1-Hydroxy-benzotriazol und 3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazin wesentlich saurer als *N*-Hydroxy-succinimid. In gleichem Sinn wächst auch die Nucleophilie. Sie ändert sich natürlich nicht immer entsprechend der Acidität, so ist z. B. 4-Hydroxy-1.2.3-benzotriazin, das etwa die gleiche Acidität wie *N*-Hydroxy-succinimid besitzt, als Zusatz weniger geeignet als *N*-Hydroxy-succinimid. 3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-chinazolin mit dem gleichen *pK*-Wert bewährt sich dagegen besser als *N*-Hydroxy-succinimid. Auch ist 3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazin offensichtlich nucleophiler als 1-Hydroxy-benzotriazol, obwohl beide Substanzen den gleichen *pK*-Wert haben.

Tab. 6. pK -Werte einiger *N*-Hydroxyverbindungen im Vergleich zu 4-Hydroxy-1,2,3-benzotriazin und Eisessig (Bestimmt aus der Näherungsformel $pH - pK = \lg \alpha / 1 - \alpha$ für $\alpha = 0.5$ in 0,111 *m* Diäthylenglykoldimethyläther/Wasser-Lösung (50 : 40) bei 54°)

Verbindung	pK
3-Hydroxy-4-oxo-2-phenyl-3,4-dihydro-chinazolin	5.2
4-Hydroxy-1,2,3-benzotriazin	5.15
<i>N</i> -Hydroxy-succinimid	5.1
3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-chinazolin	5.1
3-Hydroxy-4-oxo-2-methyl-3,4-dihydro-chinazolin	5.0
Eisessig	4.8
1-Hydroxy-benzotriazol	4.3
3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin	4.3

Welch große Rolle die Nucleophilie bei der Racemisierung spielt, beobachteten *Goodman* und *McGahren*²²⁾, die aus einem optisch aktiven Dipeptidazlacton durch Umsetzung mit dem stark nucleophilen Hydrazin optisch voll aktives Hydrazid gewannen, während die Reaktion mit Ammoniak oder Aminosäureestern partiell oder völlig racemisiertes Material lieferte.

Das schlechte Abschneiden der in der 2-Stellung substituierten 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-chinazolin-Derivate beruht vermutlich auf sterischer Hinderung der Hydroxygruppe durch den 2-Substituenten.

Bei der Verknüpfung von *N*-Acyl-peptiden mit freien, an der Carboxylgruppe ungeschützten Peptiden ist die „Eintopf-Methode“ nicht anwendbar. In einem solchen Fall muß das *N*-Acyl-peptid als Carboxylkomponente voraktiviert werden. Bislang verwendete man dazu hauptsächlich die racemisierungsfreie Azid-Methode²³⁾ oder die „backing-off-Methode“ nach *Goodman*²⁴⁾, bei der z. B. ein Aminosäureaktivesterhydrobromid mit einer *N*-Acyl-aminosäure mittels DCCD zum *N*-Acyl-dipeptid-aktivester verknüpft wurde. Breite Anwendung fand diese Methode bei der Herstellung von *N*-Acyl-dipeptid-[1-hydroxy-piperidinstern]²⁵⁾, die ohne Racemisierung zu höheren Peptiden umgesetzt werden können. Diese 1-Hydroxy-piperidinstern sind jedoch sehr reaktionsträge und geben bei sterischer Hinderung nur sehr schlechte Ausbeuten. Neuerdings oxydierte man *p*-Methylmercapto-phenylester, die als Carboxylschutzgruppe dienen können, zu den entsprechenden Sulfonen, welche dann die Eigenschaften von aktivierten Estern besitzen²⁶⁾. Alle diese Methoden haben jedoch Nachteile. Bei der Azid-Methode muß man mit Nebenprodukten aus dem Curtius-Abbau der Säureazide rechnen, die aktivierten Ester, die man nach der „backing-off-Methode“ herstellt, sind meist nicht sehr reaktionsfähig und bei der Oxydation von *p*-Methylmercapto-phenylestern zu den Sulfonen können oxydationsempfindliche Aminosäuren Schaden erleiden.

Deshalb erschien es uns wichtig, nach aktivierten Estern zu suchen, die man aus *N*-geschützten Peptiden mittels DCCD und der Hydroxykomponente ohne Racemisierung herstellen kann. Die Herstellung von *N*-Hydroxy-succinimidestern mittels

22) *M. Goodman* und *W. J. McGahren*, *J. Amer. chem. Soc.* **88**, 3887 (1966).

23) *Th. Curtius*, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **35**, 3226 (1902).

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

25) *F. Weygand* und *W. König*, *Z. Naturforsch.* **20b**, 710 (1965); *F. Weygand*, *W. König*, *E. Nintz*, *D. Hoffmann*, *P. Huber*, *N. M. Khan* und *W. Prinz*, ebenda **21b**, 325 (1966).

26) *B. J. Johnson* und *P. M. Jacobs*, *Chem. Commun.* **1968**, 73.

DCCD bereitet in einigen Fällen Schwierigkeiten. Löw und Kisfaludy²⁷⁾ berichteten, daß bei sterisch gehinderten *N*-Acyl-peptiden die *N*-Hydroxy-succinimidester nicht herstellbar waren. Auch wir fanden, daß sich z. B. bei der Sequenz Z-Gly-Leu-Gln-Ala-OH (Sequenz 20–23 des Schweine-Proinsulins) der *N*-Hydroxy-succinimidester nur in ganz geringen Ausbeuten bildete²⁸⁾, während sich das gleiche Peptid nach der

Tab. 7. Racemisierung bei der Voraktivierung von Boc-Leu-Phe-OH mit DCCD und *N*-Hydroxyverbindungen und der anschließenden Umsetzung mit HCl·H-Val-O^tBu und einer tert. Base (Reaktionsbedingungen: 1 Stde. bei 0° und 1 Stde. bei Raumtemp. zur Voraktivierung; eine weitere Stde. bei Raumtemp. für die Umsetzung mit H-Val-O^tBu)

Äquiv.	Zusatz	Lösungs- mittel	Base	zur Aktiv. ²⁹⁾ D-Phe-L-Val	%
1	<i>N</i> -Hydroxy-succinimid	DMF	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	2.3
1.2	<i>N</i> -Hydroxy-succinimid	DMF	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	2.3
2	<i>N</i> -Hydroxy-succinimid	DMF	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	1.65
2	<i>N</i> -Hydroxy-succinimid	DMF	<i>N</i> -Äthylmorpholin	+	<1.0
2	<i>N</i> -Hydroxy-succinimid	DMF	<i>N</i> -Methylmorpholin	+	2.1
				+	2.1
2	<i>N</i> -Hydroxy-succinimid	DMF	<i>N</i> -Äthyl-diisopropyl- amin	+	1.2
				+	3.7
2	<i>N</i> -Hydroxy-succinimid	DMF	Triäthylamin	+	5.0
				+	9.9
1	<i>N</i> -Hydroxy-succinimid	Pyridin	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	6.1
2	<i>N</i> -Hydroxy-succinimid	Pyridin	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	8.1
1	1-Hydroxy-benzotriazol	DMF	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	4.4 ¹⁴⁾
2	1-Hydroxy-benzotriazol	DMF	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	9.3
2	1-Hydroxy-benzotriazol	DMF	<i>N</i> -Äthylmorpholin	+	4.0
1	3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro- chinazolin	DMF	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	4.0
2	3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro- chinazolin	DMF	<i>N</i> -Äthylmorpholin	+	6.5
2	3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro- chinazolin	DMF	Triäthylamin	+	6.8
2	3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro- chinazolin	DMF	<i>N</i> -Äthyl-diisopropyl- amin	+	6.6
2	3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro- chinazolin	DMF	<i>N</i> -Methylmorpholin	+	3.2
1	6-Brom-3-hydroxy-4-oxo- 3.4-dihydro-chinazolin	DMF	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	<1.0
1	3-Hydroxy-4-oxo-2-methyl- 3.4-dihydro-chinazolin	DMF	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	6.15
1	6-Brom-3-hydroxy-4-oxo-2-methyl- 3.4-dihydro-chinazolin	DMF	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	5.0
1	3-Hydroxy-4-oxo-2-phenyl- 3.4-dihydro-chinazolin	DMF	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	6.6
1	3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro- 1.2.3-benzotriazin	DMF	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	<1.0
1	3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro- 1.2.3-benzotriazin	THF	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	<1.0
1	3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro- 1.2.3-benzotriazin	CH ₂ Cl ₂	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	<1.0
1	3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro- 1.2.3-benzotriazin	DMA	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	<1.0
1	3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro- 1.2.3-benzotriazin	Pyridin	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	1.65
2	3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro- 1.2.3-benzotriazin	DMF	<i>N</i> -Äthylmorpholin	+	6.45
1	6-Brom-3-hydroxy-4-oxo- 3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazin	DMF	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	1.1
1	4-Hydroxy-1.2.3-benzotriazin	DMF	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	33.0

²⁷⁾ M. Löw und L. Kisfaludy, Acta chim. Acad. Sci. hung. 44, 61 (1965).

²⁸⁾ R. Geiger, G. Jäger, W. König und A. Volk, Z. Naturforsch. 24b, 999 (1969).

²⁹⁾ + bedeutet, daß die tert. Base schon zur Aktivierung zugegeben wird, — bedeutet, daß die Base erst nach der Zugabe von HCl·H-Val-O^tBu zugegeben wird.

DCCD/HOSu-, „Eintopf-Methode“ glatt mit einem Aminosäureester umsetzte. Der Schluß lag nahe, daß der basische Aminosäureester die Bildung des *N*-Hydroxy-succinimidesters beschleunigt. Durch Zugabe von *N*-Äthyl-morpholin wurde die Ausbeute an *N*-Acyl-peptid-[*N*-hydroxy-succinimidester] tatsächlich beträchtlich erhöht²⁸⁾. Die Untersuchungen ergaben, daß die Racemisierung durch Zugabe schwacher Basen wie *N*-Äthyl-morpholin nicht erhöht wird, sondern sogar gesenkt werden kann (Tabb. 7 und 8). Während bei der Umsetzung von Boc-Leu-Phe-OH mit *N*-Hydroxy-succinimid und DCCD in Dimethylformamid 2.3% *D*-Verbindung

Tab. 8. Racemisierung bei der Voraktivierung von Tfa-Pro-Val-OH mit DCCD und *N*-Hydroxyverbindungen und der anschließenden Umsetzung mit HCl·H-Pro-Obu und einer tert. Base in DMF als Lösungsmittel (Reaktionsbedingungen wie bei Tab. 7)

Äquivv.	Zusatz	Base	zur Aktiv. ²⁹⁾	% <i>L-D-1</i> -Verb.
1	<i>N</i> -Hydroxy-succinimid	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	30.4
2	<i>N</i> -Hydroxy-succinimid	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	19.4
2	<i>N</i> -Hydroxy-succinimid	<i>N</i> -Äthylmorpholin	+	20.7
2	<i>N</i> -Hydroxy-succinimid	<i>N</i> -Methylmorpholin	+	17.6
2	<i>N</i> -Hydroxy-succinimid	<i>N</i> -Äthyl-diisopropylamin	+	20.0
2	<i>N</i> -Hydroxy-succinimid	Triäthylamin	+	13.5
1	1-Hydroxy-benzotriazol	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	13.2
1	3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-chinazolin	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	6.4
1	6-Brom-3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-chinazolin	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	7.3
1	3-Hydroxy-4-oxo-2-methyl-3,4-dihydro-chinazolin	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	57.1
1	6-Brom-3-hydroxy-4-oxo-2-methyl-3,4-dihydro-chinazolin	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	41.6
1	3-Hydroxy-4-oxo-2-phenyl-3,4-dihydro-chinazolin	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	40.5
1	3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	1.3
1	6-Brom-3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	6.2
1	4-Hydroxy-1,2,3-benzotriazin	<i>N</i> -Äthylmorpholin	—	39.2

gefunden wurden, konnte die Racemisierung bei Zugabe von *N*-Äthyl-morpholin auf < 1% gesenkt werden. Triäthylamin wirkte racemisierungssteigernd. Wie schon an anderer Stelle berichtet wurde, eignen sich die 1-Hydroxy-benzotriazole nicht zur Voraktivierung von Peptiden¹⁴⁾. Auch ein Basenzusatz bewirkt hier keine entscheidende Verbesserung. Von den Chinazolinderivaten schneidet das 6-Brom-3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-chinazolin dagegen sehr gut ab. Die besten Ergebnisse wurden mit 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin erzielt. Interessant ist, daß hier im Gegensatz zur Herstellung von *N*-Hydroxy-succinimidestern ein Basenzusatz während der Voraktivierung die Racematbildung fördert. Bei der Voraktivierung von Tfa-Pro-Val-OH (Tab. 8) konnte sich nur das 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin als Hydroxykomponente behaupten. Man fand nur 1.3% *D*-Verbindung, während bei Verwendung von *N*-Hydroxy-succinimid als Aktivierungskomponente zwischen 13.5 und 30.4% *D*-Verbindung entstanden.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren bestimmt und sind nicht korrigiert. Die Drehwerte wurden in einem 1-dm-Rohr im lichtelektrischen Polarimeter der Fa. Perkin-Elmer gemessen. Die chromatographische Reinheit wurde auf Dünnschichtplatten (E. Merck) in verschiedenen Laufmitteln geprüft.

Abkürzungen:

Boc	tert.-Butyloxycarbonyl	HOSu	<i>N</i> -Hydroxy-succinimid
DCCD	Dicyclohexylcarbodiimid	O ^t Bu	tert.-Butylester
DMA	Dimethylacetamid	Tfa	Trifluoracetyl
DMSO	Dimethylsulfoxid	THF	Tetrahydrofuran
HOBt	1-Hydroxy-benzotriazol	Z	Benzyloxycarbonyl

1. *Boc-Leu-Phe-Val-O^tBu-Racemisierungstest*: Es wird analog l. c.^{14,7)} verfahren (Tabb. 1 und 7).

2. *Tfa-Pro-Val-Pro-O^tBu-Racemisierungstest*

a) *Prüfung auf Racemisierung bei der „Eintopf-Methode“* (Tabb. 2 und 3): Zu einer Lösung von 309.3 mg (1 mMol) *Tfa-Pro-Val-OH* und 171 mg (1 mMol) *H-Pro-O^tBu* (Tab. 3) oder 209.7 mg (1 mMol) *HCl·H-Pro-O^tBu* und 0.12 ccm *N-Äthyl-morpholin* (Tab. 2) in 2 ccm Dimethylformamid gibt man den *Zusatz* und bei 0° eine ebenfalls auf 0° abgekühlte Lösung von 207 mg (1 mMol) *DCCD* in 1 ccm Dimethylformamid. Man läßt 1 Stde. bei 0° und 1 Stde. bei Raumtemp. stehen (Tab. 3: 4 Stdn. bei 0° und über Nacht bei Raumtemp.), verdünnt die Ansätze mit etwa 30 ccm Essigester, filtriert den ausgefallenen Niederschlag ab, schüttelt das Filtrat mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, 2*n* Citronensäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser aus, trocknet mit Natriumsulfat, engt ein und chromatographiert den Rückstand in Essigester über 3 g basisches Al₂O₃ (Woelm, Aktivstufe 1). Das Eluat (etwa 40 ccm) wird eingengt und der Rückstand in etwa 2 ccm 90proz. *Trifluoressigsäure* gelöst. Man läßt 1 Stde. bei Raumtemp. stehen, engt ein, löst den Rückstand in Essigester und versetzt bis zur bleibenden Gelbfärbung mit einer ätherischen *Diazomethan-Lösung*. Diese Lösung wird konzentriert und wie bei *Weygand* und Mitarbb.¹¹⁾ gaschromatographiert.

b) *Prüfung auf Racemisierung bei der „Voraktivierung“ von Tfa-Pro-Val-OH mit DCCD und verschiedenen N-Hydroxyverbindungen* (Tab. 8): Zu einer Lösung von 309.3 mg (1 mMol) *Tfa-Pro-Val-OH* und *Zusatz* in 2 ccm Dimethylformamid wird bei 0° eine auf 0° abgekühlte Lösung von 207 mg (1 mMol) *DCCD* in 1 ccm Dimethylformamid zugegeben und 1 Stde. bei 0° und 1 Stde. bei Raumtemp. stehengelassen. Dann gibt man 209.7 mg (1 mMol) *HCl·H-Pro-O^tBu* und 0.12 ccm *N-Äthyl-morpholin* zu, läßt nochmals 1 Stde. bei Raumtemp. stehen und arbeitet wie bei 2a) auf.

3. *Z-Pro-Val-Pro-O^tBu-Racemisierungstest*

a) *Prüfung auf Racemisierung bei der „Eintopf-Methode“* (Tabb. 4 und 5): Zu einer Lösung von 348.4 mg (1 mMol) *Z-Pro-Val-OH* und 171 mg (1 mMol) *H-Pro-O^tBu* (Tab. 5) oder 209.7 mg (1 mMol) *HCl·H-Pro-O^tBu* und 0.12 ccm *N-Äthyl-morpholin* (Tab. 4) in 2 ccm DMF gibt man den *Zusatz* und bei 0° eine ebenfalls auf 0° abgekühlte Lösung von 207 mg (1 mMol) *DCCD* in 1 ccm DMF. Man läßt 1 Stde. bei 0° und 1 Stde. bei Raumtemp. stehen (Tab. 5: 4 Stdn. bei 0°, über Nacht bei Raumtemp.) und arbeitet analog 2a) auf. Das Eluat aus der Al₂O₃-Säule wird eingengt und der Rückstand in Methanol am Autotitrat (Zugabe von methanolischer HCl) bei pH 4.5 katalytisch hydriert. Nach beendeter Hydrierung wird der Katalysator abfiltriert, das Filtrat i. Vak. eingengt und der Rückstand in 1 ccm Methanol gelöst. Dazu gibt man 1 ccm Trifluoressigsäure-methylester und bis zur basischen Reaktion tropfenweise *N-Äthyl-morpholin*, läßt über Nacht bei Raumtemp. stehen, engt ein,

nimmt den Rückstand in Essigester auf und schüttelt mit 2*n* Citronensäure, Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser aus, trocknet mit Natriumsulfat und engt wieder ein. Die zurückbleibende Substanz löst man in 2 ccm 90proz. *Trifluoressigsäure*, läßt 1 Stde. bei Raumtemp. stehen, engt ein, löst den Rückstand in Essigester und versetzt bis zur bleibenden Gelbfärbung mit einer ätherischen *Diazomethan*-Lösung. Die Lösung wird konzentriert und wie bei *Weygand* und Mitarbb.¹¹⁾ gaschromatographiert.

b) *Z-Pro-Val-OH*: 12.1 g (30 mMol) *Z-Pro-Val-O^tBu*¹⁴⁾ werden in 25 ccm wasserfreier *Trifluoressigsäure* 20 Min. bei Raumtemp. stehengelassen. Man engt bei 25° Badtemp. i. Vak. ein, destilliert 2mal mit Äther nach und nimmt den Rückstand in Essigester auf. Mit Natriumhydrogencarbonatlösung wird nun extrahiert, mit halbkonz. Salzsäure die wäßrige Phase auf pH 1–2 angesäuert, mit Essigester das ausfallende Öl extrahiert, die Essigesterphase mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingengt. Aus Essigester/Petroläther Ausb. 6.9 g (66%), Schmp. 138°, $[\alpha]_D^{20}$: -54.9° (*c* = 2, Methanol).

$C_{18}H_{24}N_2O_5$ (348.4) Ber. C 62.06 H 6.94 N 8.04 Gef. C 62.0 H 7.1 N 8.1

c) *HCl-H-Pro-O^tBu*: Durch katalytische Hydrierung von *Z-Pro-O^tBu*³⁰⁾ in Methanol an einem Autotitrator (Zugabe von methanolischer HCl) bei pH 4.5; Schmp. 110–112°.

4. *5-Brom-anthranilhydroxamsäure*: Eine Lösung von 27.5 g (0.395 Mol) *Hydroxyaminhydrochlorid* in 200 ccm Methanol wird bei 50–60° mit 31.8 g (0.795 Mol) *NaOH* versetzt. Nachdem sich die Base gelöst hat, wird auf 0° abgekühlt und das ausfallende NaCl abgesaugt. Zu dem Filtrat gibt man eine Lösung von 91.5 g (0.395 Mol) *5-Brom-anthranilsäure-methylester* in 400 ccm Methanol, läßt 2 Stdn. bei Raumtemp. stehen und engt ein. Der Rückstand wird mit Äther verrieben, abgesaugt, in Wasser gelöst und mit *HCl* auf pH 4–5 gestellt. Es fällt ein Niederschlag aus, der abgesaugt und über P_4O_{10} getrocknet wird. Ausb. 61.5 g (68%), Schmp. 162–165° (Zers.).

$C_7H_7BrN_2O_2$ (231.0) Ber. C 36.39 H 3.05 N 12.13 Gef. C 36.6 H 3.2 N 12.4

5. *6-Brom-3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin*: Zu einer Suspension von 11.55 g (50 mMol) *5-Brom-anthranilhydroxamsäure* in 25 ccm halbkonz. Salzsäure läßt man bei 5° unter Rühren innerhalb 45 Min. eine Lösung von 3.65 g (53 mMol) *Natriumnitrit* in 15 ccm Wasser fließen. Bei Raumtemp. wird 1 Stde. nachgerührt, der Niederschlag dann abgesaugt und aus Wasser umkristallisiert. Ausb. 5.0 g (41%), Schmp. 178° (Zers.).

$C_7H_4BrN_3O_2$ (242.1) Ber. C 34.74 H 1.67 N 17.37 Gef. C 34.1 H 1.9 N 17.3

6. *6-Brom-3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-chinazolin*: 10 g (43.3 mMol) *5-Brom-anthranilsäure* werden 15 Min. in 30 ccm *Ameisensäure* unter Rückfluß gekocht. Anschließend gibt man 100 ccm Wasser zu, kühlt auf 0° und saugt ab. Aus Äthanol/Wasser Ausb. 5.8 g (56%), Schmp. 257–260°.

$C_8H_5BrN_2O_2$ (241.1) Ber. C 39.85 H 2.09 N 11.62 Gef. C 40.1 H 1.9 N 11.3

7. *6-Brom-3-hydroxy-4-oxo-2-methyl-3,4-dihydro-chinazolin*: 10 g (43.3 mMol) *5-Brom-anthranilhydroxamsäure* werden mit 60 ccm *Acetanhydrid* 20 Min. unter Rückfluß erhitzt. Anschließend werden 60 ccm Wasser zugegeben und weitere 5 Min. unter Rückfluß gekocht. Es wird gekühlt, abgesaugt und aus Äthanol/Wasser umkristallisiert. Ausb. 4.45 g, Schmp. 210–223°. Die Analyse für diese Substanz war nicht zufriedenstellend. Zur weiteren Reinigung wird die Substanz in heißer Natriumhydrogencarbonatlösung aufgenommen. Von Unlöslichem wird filtriert und das Filtrat mit konz. Salzsäure angesäuert. Der Niederschlag wird abgesaugt, gut mit Wasser gewaschen, mit Äthanol aufgekocht, wieder abgesaugt und getrocknet. Schmp. 257°.

$C_9H_7BrN_2O_2$ (255.1) Ber. C 42.37 H 2.77 N 10.98 Gef. C 42.4 H 2.7 N 11.1

³⁰⁾ G. W. Anderson und F. M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. **82**, 3359 (1960).