

Wolfgang König und Rolf Geiger

Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid und 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin

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

(Eingegangen am 2. Februar 1970)

3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin (1)¹⁾ eignet sich als Zusatz bei der Dicyclohexylcarbodiimid-Methode²⁾ (DCCD-Methode) zur Synthese von Peptiden. *N*-Acyl-harnstoff-Bildung und Racemisierung unterbleiben. Auch die Voraktivierung von *N*-geschützten Peptiden und Aminosäuren mittels DCCD gelingt mit dieser Verbindung ohne Racemisierung. Mit Nebenprodukten ist jedoch zu rechnen: aus 2 Mol 1 und 1 Mol DCCD entsteht 3-[2-Azido-benzoyloxy]-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin (2). 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-chinazolin¹⁾ ist als Zusatz bei der DCCD-Methode weniger geeignet.

A New Method for the Synthesis of Peptides: Activation of the Carboxy Group with Dicyclohexylcarbodiimide and 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazine

3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazine¹⁾ (1) is a suitable additive in the DCCD method²⁾ for peptide synthesis. Racemization and formation of *N*-acylurea is prohibited. It is also possible to prepare the activated esters of *N*-protected peptides and amino acids with this compound without racemization. By-products may be formed however: Two moles 1 and one mol DCCD react to give 3-(2-azidobenzoyloxy)-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazine. 3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydroquinazolin¹⁾ is a less suited additive in this method.

Um die Racemisierung bei Peptidsynthesen nach der DCCD-Methode zu senken, wurden bisher bevorzugt *N*-Hydroxy-succinimid (HOSu)³⁻⁵⁾ oder 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)^{6,7)} zugesetzt. Mit dem modifizierten gaschromatographischen Racemisierungstest nach Weygand und Mitarbeiter⁸⁾ (Tfa-Pro-Val-OH + H-Pro-O^tBu⁹⁾) fanden wir, daß bei Anwendung der DCCD-Methode ein Zusatz von 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin (1) die Racemisierung stärker senkt als die genannten Verbindungen¹⁰⁾. Auch bei der Voraktivierung von *N*-Acyl-peptiden

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

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

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

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

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

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

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

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

9) Nomenklatur und Abkürzungen entsprechen den Vorschlägen der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 256 (1967).

10) W. König und R. Geiger, Chem. Ber. 103, 2024 (1970), vorstehend.

war diese Verbindung im oben genannten Racemisierungstest anderen Zusätzen überlegen. Wir prüften deshalb an einem größeren experimentellen Material, ob **1** als Zusatz bei der DCCD-Methode und als Hydroxykomponente für aktivierte Ester allgemein mit Vorteil verwendet werden kann.

Wie man aus Tab. 1 entnehmen kann, bewährte sich **1** bei der „Eintopf-Methode“ in Bezug auf die Ausbeute zwar weniger als 1-Hydroxy-benzotriazol, jedoch besser als *N*-Hydroxy-succinimid.

Tab. 1. Vergleichende Versuche bei der Herstellung von Peptiden nach der DCCD-Methode mit verschiedenen Zusätzen

Peptid	Äquivv. Zusatz	% Ausbeute und (Schmp.)		
		DCCD/ 1	DCCD/HOBT ⁽⁶⁾	DCCD/HOSu ⁽⁷⁾
Z-Val-Val-OMe	1	79% (90–94°)		
	2	82% (94–95°)	93% (99–102°)	69% (76–82°)
Z-Gln-Ala-O ^t Bu	1	69% (158–160°)	74% (158–160°)	
Z-Lys(Boc)-Gly-NH-Mbh ⁽¹¹⁾	1	82% (125–127°)	91% (123–125°)	

Die geringeren Ausbeuten bei der Verwendung von **1** als Zusatz beruhen hier, wie auch beim *N*-Hydroxy-succinimid, auf der Bildung von Nebenprodukten. So berichteten Löw und Kisfaludy⁽¹²⁾, daß *N*-Hydroxy-succinimid selbst mit DCCD reagiert und daß sterisch gehinderte *N*-Acyl-peptid-[*N*-hydroxy-succinimidester] nicht herstellbar waren. Eine Verbindung aus einem Molekül DCCD und drei Molekülen *N*-Hydroxy-succinimid wurde später als Succinimidooxycarbonyl- β -alanin-[*N*-hydroxy-succinimidester] erkannt⁽¹³⁾, der mit Aminen zu Succinimidooxycarbonyl- β -alanin-amiden bzw. zu Harnstoffderivaten des β -Alanins reagiert. Eine analoge Verbindung entsteht aus einem Molekül DCCD und drei Molekülen *N*-Hydroxy-glutarimid⁽¹⁴⁾. Auch Weygand und Mitarbb.⁽¹⁵⁾ isolierten bei der Umsetzung von Boc-Glu-OBz mit 2.4.6-Trimethoxy-benzylamin nach der DCCD/HOSu-Methode Succinimidooxycarbonyl- β -alanin-[2.4.6-trimethoxy-benzylamid]. Ähnlich reagiert auch **1**. So entsteht aus zwei Molekülen **1** und einem Molekül DCCD unter Ringöffnung 3-[2-Azido-benzoyloxy]-4-oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazin (**2**), das z. B. mit Benzylamin das Benzylamid **3** ergibt. Die schlechteren Ausbeuten und die beobachteten Verunreinigungen bei der Verwendung von **1** als Zusatz beim Eintopf-Verfahren gehen wohl auf die Ringöffnung von **1** zurück. **2** reagiert mit der Amino-komponente zu der entsprechenden 2-Azido-benzoyl-Verbindung.

Bei der Voraktivierung von *N*-Acyl-aminosäuren und -peptiden mit DCCD und **1** wurde diese Nebenproduktbildung nicht in dem Maße beobachtet wie beim „Eintopf-Verfahren“. So erhielten wir z. B. Z-Val-Val-OMe aus nicht isoliertem Z-Val-OObt⁽¹⁶⁾ mit 80% Ausb. (Schmp. 107–109°). Aus nicht isoliertem *N*-Hydroxy-succinimidester

⁽¹¹⁾ W. König und R. Geiger, Chem. Ber. **103**, 2041 (1970); Mbh = 4.4'-Dimethoxy-benzylhydridyl-Rest.

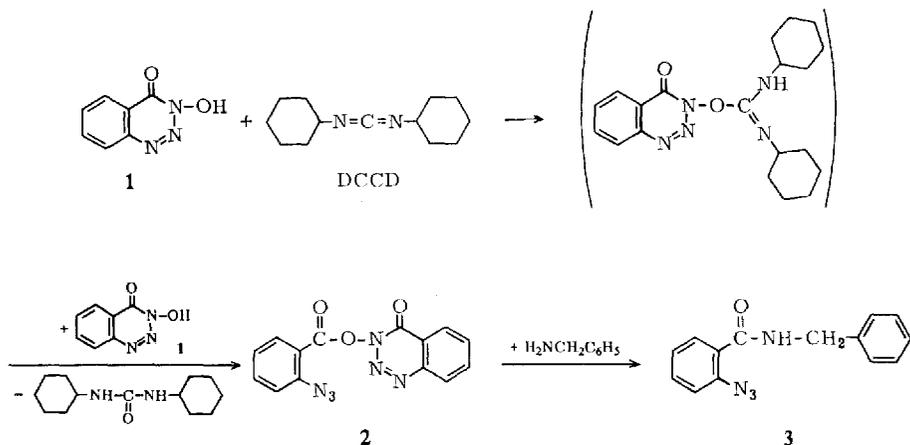
⁽¹²⁾ M. Löw und L. Kisfaludy, Acta chim. Acad. Sci. hung. **44**, 63 (1965).

⁽¹³⁾ H. Gross und L. Bilk, Tetrahedron [London] **24**, 6935 (1968).

⁽¹⁴⁾ H. Jeschkeit, Z. Chem. **9**, 111 (1969).

⁽¹⁵⁾ F. Weygand, W. Steglich und N. Chytil, Z. Naturforsch. **23b**, 1391 (1968).

⁽¹⁶⁾ OObt = 3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazin-ester; HOOBt = **1**.



wurden dagegen 81% mit einem Schmp. von nur 82–86° erhalten. Bei der Verknüpfung von nicht isoliertem Z-Pro-OObt¹⁶⁾ mit H-Lys(Boc)-Gly-NH-Mbh¹¹⁾ wurde das Tripeptid in nahezu quantitativer Ausbeute isoliert. Im IR-Spektrum von ungereinigtem Z-Phe-OObt¹⁶⁾ war die intensive und charakteristische Azido-Bande bei 2120/cm nicht erkennbar. Das bedeutet, daß sich 1 mit Z-Phe-OH und DCCD quantitativ zu Z-Phe-OObt umgesetzt hat.

Die CO-Frequenzen der neuen aktivierten Ester liegen bei 1810–1815/cm. Die Verbindungen sind demzufolge äußerst reaktionsfähig, scheinen aber gegen Hydrolyse oder Alkoholyse recht beständig zu sein. So lassen sich z. B. die stabilen kristallisierten Ester von Z-Threonin und Z-Serin in guten Ausbeuten herstellen. Meist kristallisierten die neuen N-Acyl-aminosäureester aber nur schlecht und werden ohne weitere Reinigung zur Peptidsynthese eingesetzt. 1 kann wie 1-Hydroxy-benzotriazol aus den Reaktionsprodukten durch Behandeln mit Natriumhydrogencarbonatlösung oder mit Alkoholen entfernt werden.

Zur weiteren Erprobung dieser neuen Methode wurde das Pentapeptid H-Gly-Val-Cys(Trt)-Ser-Leu-OH aus der A-Kette des Schaf-Insulins (A 9–13) hergestellt.

Trotz großer sterischer Hinderung in der Umgebung der S-Tritylgruppe verlief die Kupplung von Boc-Gly-Val-OObt mit H-Cys(Trt)-Ser-Leu-OH mit über 90% Ausbeute. Die Boc-Gruppe konnte in Gegenwart der S-Trityl-Gruppe mit wasserfreier Trifluoressigsäure selektiv abgespalten werden^{17, 18)}. Auch Z-Val-Glu(O^tBu)-Gln(Mbh)-OMe, ebenfalls ein Peptid aus der A-Kette des Insulins (A 3–5), ließ sich nach der neuen Methode in sehr guten Ausbeuten herstellen.

Bei unseren Racemisierungsuntersuchungen¹⁰⁾ fanden wir, daß ein Zusatz von 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-chinazolin¹⁾ die Racemisierung bei der DCCD-Methode etwa im gleichen Maße wie 1-Hydroxy-benzotriazol senkt. Die experimentelle Anwendung dieses Zusatzes ergab jedoch keine Vorteile. Die Ausbeuten sind schlechter und die Verbindung ist wegen ihrer geringen Löslichkeit oft nur schwer zu entfernen.

¹⁷⁾ W. König, R. Geiger und W. Siedel, Chem. Ber. 101, 681 (1968).

¹⁸⁾ L. Zervas, I. Photaki und I. Phocas, Chem. Ber. 101, 3332 (1968).

Gly	Val	Cys	Ser	Leu	
			Z—OH DCCD/1	H—O ^t Bu	
			Z	O ^t Bu	89 %
			H ₂ /Pd		
		Boc—Trt OH	H	O ^t Bu	100 %
		Boc—Trt DCCD/1		O ^t Bu	91 %
Boc		H—Trt TFE ^{a)}		OH	82 %
Boc		Trt		OH	93 %
H	TFE ^{a)}	Trt		OH	87 %

^{a)} TFE = Trifluoressigsäure.

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. Carl Zeiss gemessen, die Werte der D-Linie graphisch ermittelt. Chromatographische Reinheitsprüfung wurde auf Dünnschichtplatten (E. Merck) in verschiedenen Laufmitteln vorgenommen.

Mbh = 4,4'-Dimethoxy-benzhydryl

OObt = 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin-ester
= 1-Ester.

1. Allgemeine Vorschrift für die Synthese von Peptiden nach der Dicyclohexylcarbodiimid/3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin-Methode

Zu einer Lösung oder Suspension von 10 mMol einer *N*-Acyl-aminosäure bzw. eines *N*-Acyl-peptids und 10 mMol eines Aminosäure- bzw. Peptid-esters (bei Hydrochloriden zusätzliche Zugabe von 10 mMol *N*-Äthyl-morpholin) in etwa 20–40 ccm Lösungsmittel gibt man 1,68 g (10 mMol) **1** und bei 0° 2,2 g *DCCD*. Man läßt nun 1 Stde. bei 0° und 1 Stde. bei Raumtemp. stehen oder rühren und arbeitet wie folgt auf:

a) Der Niederschlag wird abgesaugt, das Filtrat i. Vak. eingedampft, der Rückstand in Essigester aufgenommen und die Lösung mit Natriumhydrogencarbonatlösung, 2*n* Citronensäure, Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingengt. Der Rückstand wird mit Petroläther verrieben, geeignet umkristallisiert oder über basisches Al₂O₃ (Woelm, Aktivstufe I) in Essigester oder Tetrahydrofuran chromatographiert.

b) Bei Dimethylformamid als Lösungsmittel kann das Peptidderivat mit Wasser oft ausgefällt werden. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Natriumhydrogencarbonatlösung verrieben, wieder abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

2. *Allgemeine Vorschrift für die Voraktivierung von N-Acyl-aminosäuren und -peptiden mit Dicyclohexylcarbodiimid/3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin und anschließende Umsetzung mit Aminosäure- oder Peptid-estern*

Zu der Lösung von 10 mMol einer *N-Acyl-aminosäure* bzw. eines *N-Acyl-peptids* und 1.68 g (10 mMol) **1** gibt man bei 0° 2.07 g (10 mMol) *DCCD*, läßt 1 Stde. bei 0° und 1 Stde. bei Raumtemp. stehen, gibt dann 10 mMol eines *Aminosäure-* bzw. *Peptid-esters* zu (bei *Hydrochloriden* zusätzlich Zugabe von 10 mMol *N-Äthyl-morpholin*), läßt eine weitere Stde. bei Raumtemp. stehen oder rühren und arbeitet wie bei 1a) oder 1b) auf [→ 2a) oder 2b)].

3. *Z-Val-Val-OMe*: Nach Vorschrift 2a) in Tetrahydrofuran als Lösungsmittel. Ausb. 80%, Schmp. 107–109° (Lit.¹⁹⁾; 100–103°, Lit.²⁰⁾; 100–105°).

4. *Z-Tyr-Tyr-OMe*: Nach Vorschrift 1a) in Methylenchlorid als Lösungsmittel. Ausb. 92%, Schmp. 174–175° (Lit.²¹⁾; 174–175°).

5. *Z-Gln-Ala-O^tBu*

a) Nach Vorschrift 1b) in Dimethylformamid als Lösungsmittel. Ausb. 69%, Schmp. 158–160° (Lit.²²⁾; 158–160°).

b) Nach Vorschrift 2b) in Dimethylformamid als Lösungsmittel. Ausb. 63%, Schmp. 158–161°.

6. *Z-Glu(O^tBu)-Gln(Mbh)-OMe*: 5.2 g (10 mMol) *Z-Glu(O^tBu)-OH·DCHA* und 4.25 g (10 mMol) *H-Gln(Mbh)-OMe·HCl*¹¹⁾ werden in je 20 ccm Dimethylformamid zusammengegeben. Man kühlt gut ab, saugt den ausgefallenen Niederschlag ab und versetzt das Filtrat mit 1.65 g (10 mMol) **1**. Bei 0° gibt man dann 2.2 g *DCCD* zu und verfährt wie bei Vorschrift 1b). Ausb. 5.5 g (78%), Schmp. 171–173°, $[\alpha]_D^{25}$: –6.5° (*c* = 2, Dimethylformamid).

$C_{38}H_{47}N_3O_{10}$ (705.8) Ber. C 64.66 H 6.71 N 5.96 Gef. C 64.2 H 6.9 N 6.1

7. *Z-Val-Glu(O^tBu)-Gln(Mbh)-OMe*: 4.0 g (5.67 mMol) *Z-Glu(O^tBu)-Gln(Mbh)-OMe* werden in Methanol/Dimethylformamid (1:1) mit *Pd-Katalysator* unter Zuhilfenahme eines Autotitrators bei pH 4.5 (Zugabe von 1*n* methanolischer *HCl*) katalytisch hydriert. Danach wird der Katalysator abfiltriert, das Filtrat i. Vak. eingengt, der Rückstand mit Petroläther und Äther verrieben und i. Hochvak. getrocknet. Er wird zusammen mit 1.4 g (5.6 mMol) *Z-Valin* und 0.92 g (5.5 mMol) **1** in 17 ccm Dimethylformamid bei 0° unter Rühren mit 0.73 ccm (5.7 mMol) *N-Äthyl-morpholin* und einer kalten Lösung von 1.25 g (6 mMol) *DCCD* in Dimethylformamid versetzt. Man läßt 1 Stde. bei 0° und 1 Stde. bei Raumtemp. rühren, saugt den Niederschlag ab und engt das Filtrat ein. Der Rückstand wird 2mal mit Natriumhydrogencarbonatlösung verrieben und mit Wasser gewaschen. Zur Reinigung wird mit Äthanol aufgeköcht. Ausb. 3.85 g (84%), Schmp. 200–204°, $[\alpha]_D^{25}$: –9.45° (*c* = 2, Dimethylformamid).

$C_{43}H_{56}N_4O_{11}$ (804.9) Ber. C 64.16 H 7.01 N 6.96 Gef. C 64.0 H 7.0 N 6.9

8. *Z-Lys(Boc)-Gly-NH-Mbh*: 56.2 g (0.1 Mol) *Z-Lys(Boc)-OH·DCHA* und 34 g (0.1 Mol) *H-Gly-NH-Mbh·HCl*¹¹⁾ werden in je 200 ccm Dimethylformamid zusammengegeben. Man kühlt ab, saugt den ausgefallenen Niederschlag ab, versetzt das Filtrat mit 16.3 g (0.1 Mol) **1**, gibt bei 0° eine Lösung von 22 g *DCCD* in Dimethylformamid zu und verfährt wie bei Vorschrift 1a). Der Rückstand wird aus Essigester/Petroläther umkristallisiert. Ausb. 54.2 g (82%), Schmp. 125–127° (Lit.¹¹⁾; 123–125°).

¹⁹⁾ J. W. Hinman, E. L. Caron und H. N. Christensen, J. Amer. chem. Soc. **72**, 1620 (1950).

²⁰⁾ F. Weygand, W. König, R. Buyle und H. G. Viehe, Chem. Ber. **98**, 3632 (1965).

²¹⁾ A. Barkdoll und W. Ross, J. Amer. chem. Soc. **66**, 951 (1944).

²²⁾ R. Geiger, G. Jäger, W. König und A. Volk, Z. Naturforsch. **24b**, 999 (1969).

9. *Z-Pro-Lys(Boc)-Gly-NH-Mbh*: Analog der allgemeinen Vorschrift 2a) werden 10 mMol *Z-Pro-OH* in Dimethylformamid als Lösungsmittel voraktiviert und mit 10 mMol *H-Lys(Boc)-Gly-NH-Mbh·HCl* (durch katalytische Hydrierung von *Z-Lys(Boc)-Gly-NH-Mbh* am Autotitratoren bei pH 4.5 unter Zugabe von methanolischer *HCl* gewonnen) sowie 10 mMol *N-Äthylmorpholin* umgesetzt. Ausb. 98%, Schmp. 180—183° (Lit.¹¹⁾: 180—183°).

10. *Z-Ser-Leu-O^tBu*: Nach Vorschrift 1a) in Dimethylformamid als Lösungsmittel. Ausb. 89%, Schmp. 94—95°, $[\alpha]_D^{25}$: -36.0° ($c = 2$, Methanol).

$C_{21}H_{32}N_2O_6$ (408.5) Ber. C 61.74 H 7.89 N 6.86 Gef. C 61.7 H 8.2 N 7.0

11. *H-Ser-Leu-O^tBu·HCl*: 39.4 g *Z-Ser-Leu-O^tBu* werden in Methanol mit *Pd-Katalysator* am Autotitratoren bei pH 4.5 (Zugabe von 1 n methanolischer *HCl*) katalytisch hydriert. Danach wird der Katalysator abfiltriert, das Filtrat i. Vak. eingengt und der Rückstand mit Äther verrieben. Ausb. 30 g (100%), Schmp. 196°. Aus Methanol/Äther Schmp. 205°, $[\alpha]_D^{25}$: -35.3° ($c = 2$, Methanol).

$C_{13}H_{27}N_2O_4Cl$ (310.8) Ber. C 50.21 H 8.76 N 9.02 Gef. C 50.0 H 9.0 N 9.1

12. *H-Cys(Trt)-Ser-Leu-OH*: Nach Vorschrift 1a) werden 4.7 g (10 mMol) *Boc-Cys(Trt)-OH*²³⁾ und 3.1 g (10 mMol) *H-Ser-Leu-O^tBu·HCl* in Tetrahydrofuran als Lösungsmittel umgesetzt. Der ölige Rückstand wird in Tetrahydrofuran über basisches Al_2O_3 (Woelm, Aktivstufe I) chromatographiert. Ausb. 6.6 g amorpher Schaum (91%).

Die dünn-schichtchromatographisch einheitliche Substanz läßt man bei Raumtemp. in wasserfreier *Trifluoressigsäure* 1 Stde. bei Raumtemp. stehen und engt bei 25° Badtemp. i. Vak. ein. Mit Äther wird 3mal nachdestilliert, der Rückstand i. Hochvak. getrocknet, mit Äther angelöst und mit gesättigter Natriumacetatlösung geschüttelt. Der ausfallende Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet, das amorphe Pulver in Tetrahydrofuran gelöst, von unlöslichen Bestandteilen wird filtriert und mit Petroläther das *Peptid* gefällt. Ausb. 4.35 g (82%), amorph; DC: mit ninhydrinpositiven Spuren verunreinigt; $[\alpha]_D^{20}$: $+12.3^\circ$ ($c = 1$, Eisessig).

$C_{31}H_{37}N_3O_5S \cdot H_2O$ (581.7) Ber. C 64.00 H 6.76 N 7.23 S 5.51
Gef. C 63.9 H 6.8 N 7.6 S 5.5

13. *Boc-Gly-Val-OH*: 8.75 g (50 mMol) *Boc-Gly-OH*, 8.25 g (50 mMol) **1** und 8.5 g (50 mMol) *H-Val-OMe·HCl* werden mit 6.5 ccm (50 mMol) *N-Äthylmorpholin* in 150 ccm Tetrahydrofuran nach Vorschrift 1a) umgesetzt. Ausb. 10.6 g (ölig). Nach Chromatographie in Essigester über basisches Al_2O_3 (Woelm, Aktivstufe I) Ausb. 8.7 g (ölig).

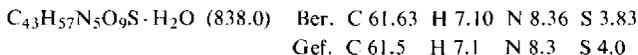
8.7 g des erhaltenen *Boc-Gly-Val-OMe* werden in 32 ccm Dioxan zunächst mit 4 ccm Wasser und dann innerhalb von 1—2 Stdn. mit 30.2 ccm 1 n *NaOH* versetzt. Nach 2 Stdn. wird mit 2 n Citronensäure neutralisiert und i. Vak. eingengt, der Rückstand bei 0° zwischen Essigester und 2 n Citronensäure verteilt, die Essigesterphase mit 2 n Citronensäure und Wasser ausgeschüttelt, mit Natriumsulfat getrocknet und eingengt. Ausb. 7.85 g. Aus Essigester/Petroläther Ausb. 6.5 g (48%), Schmp. 98—101°, $[\alpha]_D^{20}$: $+2.8^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

$C_{12}H_{22}N_2O_5$ (274.3) Ber. C 52.52 H 8.08 N 10.22 Gef. C 52.8 H 8.1 N 10.1

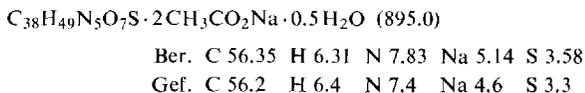
14. *Boc-Gly-Val-Cys(Trt)-Ser-Leu-OH*: Eine Lösung von 3.14 g (11 mMol) *Boc-Gly-Val-OH* und 1.82 g (11 mMol) **1** in 45 ccm Tetrahydrofuran wird bei 0° mit 2.27 g (11 mMol) *DCCD* versetzt. Man läßt 1 Stde. bei 0° und 1 Stde. bei Raumtemp. rühren, gibt dann 5.8 g (10 mMol) *H-Cys(Trt)-Ser-Leu-OH·H_2O* zu und läßt noch 1 Stde. bei Raumtemp. rühren. Der Niederschlag wird abgesaugt, das Filtrat eingengt und der Rückstand mit Äther ver-

²³⁾ H. Zahn und K. Hammerström, Chem. Ber. **102**, 1048 (1969).

rieben. Es entsteht ein amorphes Produkt, das aus Tetrahydrofuran/Petroläther umgefällt wird. Ausb. 7.8 g (93%), $[\alpha]_D^{25}$: -6.8° ($c = 2$, Dimethylformamid), DC: einheitlich.

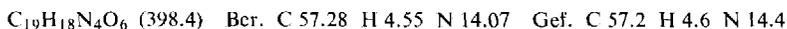


15. *H-Gly-Val-Cys(Trt)-Ser-Leu-OH*: 7.3 g *Boc-Gly-Val-Cys(Trt)-Ser-Leu-OH* werden bei Raumtemp. in wasserfreier *Trifluoressigsäure* gelöst. Man läßt 30 Min. bei Raumtemp. stehen und engt anschließend bei 25° Badtemp. i. Vak. ein. Der Rückstand wird mit Äther verrieben, abgesaugt, das amorphe Produkt in Dioxan/Wasser (6 : 4) gelöst und mit Natriumacetatlösung gefällt. Dann wird gekühlt, abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Ausb. 6.75 g (87%), $[\alpha]_D^{25}$: -19.2° ($c = 1$, 90proz. Essigsäure), DC: einheitlich.

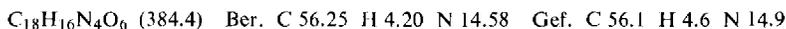


Aminosäure-Analyse: Leu_{1.03}, Val_{1.01}, Gly_{1.00}, Ser_{0.93} (Cystein wurde nicht bestimmt).

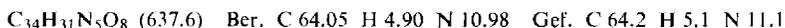
16. *Z-Thr-OObt*: Zu einer Lösung von 12.75 g (50 mMol) *Z-Threonin* und 8.25 g (50 mMol) **1** in 150 ccm absol. Tetrahydrofuran gibt man bei 0° eine Lösung von 11 g *DCCD* in eiskaltem Tetrahydrofuran, läßt 1 Stde. bei 0° und 1 Stde. bei Raumtemp. rühren, saugt anschließend den Niederschlag ab und engt das Filtrat i. Vak. ein. Der Rückstand wird mit Isopropylalkohol verrieben und abgesaugt. Aus Tetrahydrofuran/Petroläther kann umkristallisiert werden. Ausb. 16.57 g (85%), Schmp. 170° , $[\alpha]_D^{25}$: -26.6° ($c = 2$, Dimethylformamid).



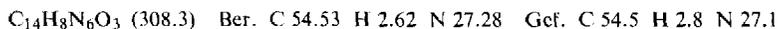
17. *Z-Ser-OObt*: 2.4 g (10 mMol) *Z-Serin* werden wie bei Versuch 16 mit 1.65 g (10 mMol) **1** umgesetzt. Ausb. 3.25 g (85%), Schmp. $128 - 130^\circ$, $[\alpha]_D^{25}$: -40.4° ($c = 2$, Dimethylformamid).



18. *Z-Asn(Mbh)-OObt*: 4.9 g *Z-Asn(Mbh)-OH*¹¹⁾ (10 mMol) werden wie bei Versuch 16 mit 1.65 g (10 mMol) **1** in Dimethylformamid umgesetzt. Ausb. 3.1 g (49%), Schmp. 175 bis 177° .



19. *3-[2-Azido-benzyloxy]-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin (2)*: Zu einer Lösung von 3.26 g (20 mMol) **1** in 20 ccm Dimethylformamid gibt man 2.07 g (10 mMol) *DCCD* und läßt über Nacht bei Raumtemp. stehen. Der Niederschlag wird abgesaugt, das Filtrat i. Vak. eingengt und der Rückstand mit Isopropylalkohol verrieben. Ausb. 2.32 g (75%), Schmp. $131 - 134^\circ$.



20. *2-Azido-benzoessäure-benzylamid (3)*: Zu einer Lösung von 3.26 g (20 mMol) **1** in Dimethylformamid gibt man 1.1 ccm (10 mMol) *Benzylamin*. Nach einigen Sekunden fällt ein gelber Niederschlag des *Benzylamin-Salzes* von **1** aus. Bei 0° setzt man unter Rühren 2.1 g (10 mMol) *DCCD* zu und läßt 1 Stde. bei 0° sowie über Nacht bei Raumtemp. rühren. Der Niederschlag wird abgesaugt, das Filtrat i. Vak. eingengt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und die organische Phase nacheinander mit NaHCO_3 -Lösung, $2n$ HCl , NaHCO_3 -Lösung und Wasser ausgeschüttelt, mit Natriumsulfat getrocknet und eingengt. Der Rückstand wird mit Petroläther verrieben. Ausb. 2.14 g (85%), Schmp. $84 - 88^\circ$.

