

benzoate of **7** solvolyses faster than the *anti*-7-norbornenyl-*p*-nitrobenzoate, by a factor of 10^8 , is attributed to a participation of the second double bond during solvolysis [13].

In accordance with this view we found, by minimizing the energy as a function of the geometry [14] of **7** and its cation **8**, that not only the distance between the formal positive center and the adjacent double bond is shortened (0.40 Å) but also the distance between the two double bonds (0.11 Å). All other bond lengths in the cation were found to be the same as the corresponding ones in **7**.

We appreciate very much the helpful discussion with Prof. R. Hoffmann, Cornell University.

REFERENCES

- [1] W. S. Johnson, Accounts of chem. Research *1*, 1 (1968) and references therein.
- [2] R. B. Clayton, Quart. Rev. *19*, 168 (1965); W. Parker & J. S. Roberts *ibid.* *21*, 331 (1967); E. E. van Tamelen, Accounts of chem. Research *1*, 111 (1968); J. W. Cornforth, Angew. Chem. *80*, 977 (1968) and references therein.
- [3] T. T. Tchen & K. Bloch, J. Amer. chem. Soc. *78*, 1516 (1956).
- [4] A. Eschenmoser, L. Ruzicka, O. Jeger & D. Arigoni, Helv. *38*, 1890 (1955); G. Stork & A. W. Burgstahler, J. Amer. chem. Soc. *77*, 5068 (1955).
- [5] R. Breslow, E. Barrett & E. Mohacsi, Tetrahedron Letters *1962*, 1207; R. Breslow, J. T. Groves & S. S. Olin, *ibid.* *1966*, 4717; R. Breslow, S. S. Olin & J. T. Groves, *ibid.* *1968*, 1837.
- [6] J. A. Pople & D. L. Beveridge, 'Approximate Molecular Orbital Theory', McGraw-Hill, New York, N.Y., 1970 and references therein.
- [7] E. E. van Tamelen & J. H. Freed, J. Amer. chem. Soc. *92*, 7206 (1970).
- [8] A. H. Andrist, J. org. Chem. *38*, 1772 (1973) and references therein.
- [9] K. B. Wiberg, Tetrahedron *24*, 1083 (1968).
- [10] P. A. Stadler, A. Nechvatal, A. J. Frey & A. Eschenmoser, Helv. *40*, 1373 (1957).
- [11] J. M. Greenwood, M. Solomon, J. K. Sutherland & A. Torre, J. chem. Soc. (C) *1968*, 3004.
- [12] A. Nickon, F. Y. Edamura, T. Iwadare, K. Matsuo, F. J. McGuire & J. S. Roberts, J. Amer. chem. Soc. *90*, 4196 (1968).
- [13] E. L. Alred & J. Hinshaw, Tetrahedron Letters *1968*, 1293.
- [14] J. W. McIver & A. Komornicki, Chem. Phys. Letters *10*, 303 (1971).

92. Die Addition von Imidazolderivaten an DCCI; eine Nebenreaktion bei der Synthese von Histidinpeptiden

von Hans Rink und Bernhard Riniker

Forschungslaboratorien der Division Pharmazeutika der CIBA-GEIGY AG, Basel

(26. III. 74)

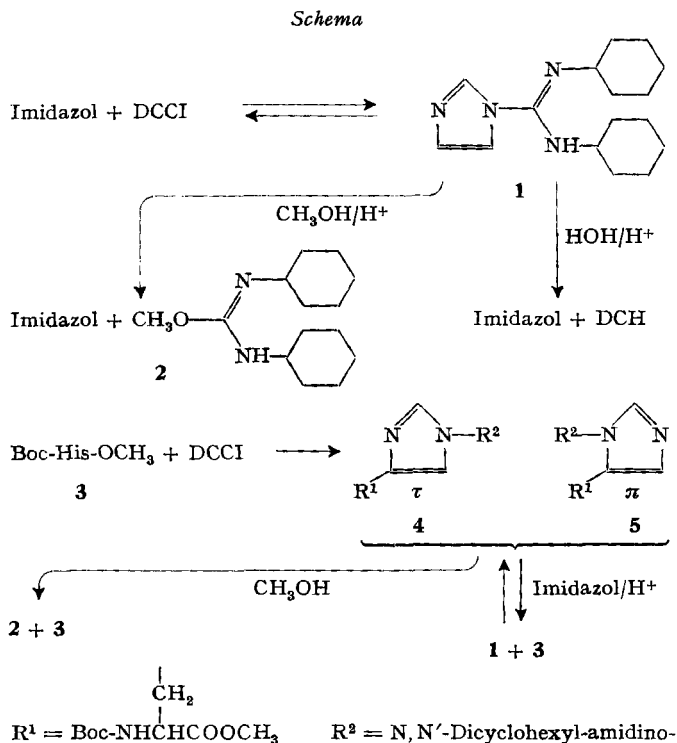
Summary. In the synthesis of histidine peptides by means of the carbodiimide method the formation of N^{1m}-amidino-histidine derivatives as secondary products has been observed. The reaction of imidazoles with DCCI leading to such compounds and their cleavage have been investigated. The significance of this side-reaction in peptide synthesis is discussed.

1. Einleitung. – Bei der Verknüpfung von längeren Peptidfragmenten nach der DCCI-Methode¹⁾ erweist es sich oft als notwendig, grössere Überschüsse an Carbo-

¹⁾ Abkürzungen: DCCI: N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, DCH: N,N'-Dicyclohexylharnstoff, HOBT: 1-Hydroxy-benzotriazol, Z: Benzylloxycarbonyl-, Boc: *t*-Butylloxycarbonyl-.

diimid einzusetzen, um einen vollständigen Umsatz zu erreichen. Bei schwerlöslichen Derivaten kann man zudem gezwungen sein, höhere Temperaturen (40–50°) einzuhalten. Unter solchen Bedingungen beobachteten wir das Auftreten von Nebenprodukten, welche auf eine Reaktion von DCCI mit der ungeschützten Imidazolfunktion von Histidin zurückgeführt werden konnten. Diese Produkte lassen sich auf Dünnschichtenchromatogrammen als UV.-absorbierende Flecken (254 nm) erkennen; sie sind lipophiler als die entsprechenden am Histidin unsubstituierten Peptide und zeigen eine sehr schwache *Pauly*-positive Reaktion. Bei zweidimensionaler Chromatographie mit schwach sauren Fließmitteln lässt sich zeigen, dass eine teilweise Rückbildung zum ursprünglichen Peptidderivat stattfindet; dabei entsteht DCH. In dieser Mitteilung werden unsere Untersuchungen zur Reaktion von DCCI mit Imidazolderivaten und die sich daraus für die Peptidchemie ergebenden Konsequenzen dargestellt.

2. Resultate. – Imidazol und DCCI reagieren in Essigester bei 50° innerhalb mehrerer Stunden unter Ausbildung eines Gleichgewichtes, wobei *ca.* 50% eines leicht durch Kristallisation isolierbaren Produktes entsteht. Nach den im experimentellen Teil angeführten Daten handelt es sich dabei um 1-(N,N'-Dicyclohexylamidino)-imidazol (**1**) (vgl. Schema). Die Reaktion wird in DMF durch einen Zusatz katalytischer Mengen einer schwachen Säure wie Pyridinhydrochlorid stark beschleunigt. Die Struktur wird durch die H^1 -NMR.-Spektren bestätigt. In gewissen Lösungsmitteln und bestimmten Temperaturbereichen lässt sich eine Verbreiterung



oder Aufspaltung der Imidazolprotonensignale erkennen. Dies dürfte auf das Vorliegen von Tautomeren oder *syn-anti*-Isomeren im Amidinsystem hinweisen.

Das Additionsprodukt einer weiteren Modellverbindung, des Boc-His-OCH₃, lässt sich chromatographisch von nicht umgesetzten Ausgangsmaterialien abtrennen. Die H¹-NMR.-Spektren des aus zwei Komponenten bestehenden Gemisches zeigen, dass die beiden Isomeren **4** und **5** im Verhältnis 3:1 vorliegen. Die Identifizierung erfolgt durch Vergleich der Ringprotonenkopplungskonstanten nach *Matthews & Rapoport* [1]. Diese Autoren beschreiben ein Verfahren zur Unterscheidung von 1,4- und 1,5-disubstituierten Imidazolen. Danach ist die dünnschichtchromatographisch lipophilere Komponente das τ -Isomere **4** (zur Nomenklatur vgl. [2]).

Am Beispiel der Reaktion von Z-Val-His-OCH₃ mit DCCI wird in Tab. 1 gezeigt, in welchem Masse sich N^{im}-Amidino-histidin-peptide unter den Bedingungen der Peptidsynthese bilden.

Tabelle 1. Addition von Z-Val-His-OCH₃ an DCCI. Bedingungen: Äquimolare Mengen, 0,1 M in DMF. Die angegebenen Umsätze (in %) wurden dünnschichtchromatographisch ermittelt

Dauer (Std.)	ohne Zusatz		1 Äqu. NEt ₃ · HCl		1 Äqu. HOBT	
	25°	50°	25°	50°	25°	50°
0,5	0	< 1	0	< 1	10	15
1	0	< 1	0	< 1	15	25
6	0	1	0	3	30	30
24	< 1	3	< 1	5		
48	< 1	5	< 1	10		

Bemerkenswert ist, dass 1-Hydroxy-benzotriazol, das bei der DCCI-Kupplung von Peptidfragmenten mit Vorteil zugesetzt wird [3], die Additionsreaktion gut katalysiert.

Beim Einsatz grösserer Histidinpeptidderivate werden vergleichbare Umsatzraten gefunden. Eine entsprechende Beobachtung machten wir bei der Synthese des Fragmentes 1–34 von menschlichem Parathromon [4]. Bei der Kondensation der Fragmente (18–24) und (25–34) wurden 13% des N^{im}-Amidino-His³²-(18–34)-Derivates durch Gegenstromverteilung abgetrennt und isoliert²⁾.

Schwach basische Nucleophile wie Methanol oder Wasser greifen **1** am Amidin-C an und regenerieren Imidazol. Dabei entsteht O-Methyl-N,N'-dicyclohexyl-isoharnstoff (**2**) [5] resp. DCH. Die Histidinderivate **4** und **5** reagieren in analoger Weise. Diese Reaktionen werden durch schwache Säuren katalysiert. **1** lässt sich mit stark basischen Aminen nicht zu trisubstituierten Guanidinen umsetzen. Dagegen stellt sich zwischen **4**, **5** und Imidazol bei saurer Katalyse ein Gleichgewicht ein; dabei bilden sich **1** und **3**. Die in Rohprodukten von Peptidkupplungen mit DCCI enthaltenen N^{im}-Amidino-histidin-Nebenprodukte lassen sich in Methanol, eventuell unter Zusatz von Pyridinhydrochlorid oder wässriger Essigsäure, in die entsprechenden N^{im}-unsubstituierten Histidinpeptide zurückführen.

²⁾ Reaktionsbedingungen: 2,5 Äqu. DCCI, 2 Äqu. HOBT (bezogen auf Carboxylkomponente), 0,035 M in DMF, 16 Std., Raumtemperatur. Mit 1,25 Äqu. DCCI entstand ca. 5% des Additionsproduktes (bei vollständigem Umsatz der Peptide).

Unter den Bedingungen, die zur Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen herangezogen werden (HCl konz./0°/10 Min. oder F₃CCOOH/25°/1 Std.), spalten die Amidino-Derivate nur in geringem Ausmasse. Dagegen wurde bei Aminosäureanalysen gefunden, dass die Histidinwerte nach saurer Totalhydrolyse innerhalb der üblichen Fehlergrenzen korrekt sind.

3. Diskussion und Folgerungen für die Peptidsynthese. – Additionen von Aminen an Carbodiimide sind bekannt. *Moffatt & Khorana* [6] haben nachgewiesen, dass die Fähigkeit zur Addition ohne Säurekatalyse mit der Basenstärke der Amine ansteigt. Die Anwesenheit von Säure bewirkt eine Umkehrung dieser Verhältnisse. Einerseits gilt als gesichert, dass die Aminkomponenten (pK_a ca. 8) bei Peptidkuppungen mit DCCI³⁾ keine Guanidin-Derivate bilden [7]; andererseits zeigt unsere Arbeit, dass Imidazole (pK_a 6–7) unter milden Bedingungen sich an DCCI addieren. Damit in Übereinstimmung stehen weitere Beobachtungen der Addition schwach basischer N–H-Verbindungen an Carbodiimide [8] [9]. Der erste Schritt zur Addition bei saurer Katalyse dürfte eine Protonierung des Carbodiimides sein, worauf der Angriff des Nucleophils erfolgt. Stark basische N–H-Verbindungen dagegen verhindern eine Aktivierung des Carbodiimides. Desgleichen dürfte auch die Spaltung der Amidino-imidazole durch eine Protonierung eingeleitet werden; stark basische Nucleophile sind daher als Spaltreagentien ungeeignet. Der Angriff des Methanols erfolgt bei der Spaltung vorwiegend an **1**. Die direkte Addition von Methanol an DCCI verläuft sehr langsam und verschiebt das Gleichgewicht von **1** zu Imidazol nur wenig.

Für die Peptidsynthese sind folgende Punkte von Bedeutung:

Die Aktivierung der Carboxylgruppe durch DCCI/HOBt wird im allgemeinen wesentlich schneller ablaufen als die hier beschriebene Addition. Diese Nebenreaktion wird deshalb bei Anwendung eines geringen Überschusses an DCCI zu vernachlässigen sein. Wenn grössere Überschüsse an DCCI oder höhere Reaktionstemperaturen nötig sind, ist jedoch die Bildung von Nebenprodukten des beschriebenen Typus zu erwarten.

Die Spaltung dieser N^{im}-Amidino-histidin-Derivate erfolgt am einfachsten durch Erwärmen des Rohproduktes der Peptidkondensation in Methanol. Sie kann leicht dünnschichtchromatographisch verfolgt werden. Vorteilhaft wird zur Beschleunigung Pyridinhydrochlorid oder Essigsäure zugefügt⁴⁾. Auf diese Weise gelingt es, die durch Addition an DCCI verursachten Nebenprodukte von histidinhaltigen Peptiden in die gewünschten, im Imidazolrest unsubstituierten Verbindungen überzuführen, und so die Ausbeute an Kondensationsprodukt zu erhöhen und dessen Reinigung wesentlich zu erleichtern.

Experimenteller Teil

Dünnschichtchromatogramme wurden an Kieselgel (Fertigplatten SL 254 der *Fa. Antec*, Birsfelden) ausgeführt. Der Nachweis der Substanzen auf den Platten erfolgte mit *Reindel-Hoppe-Reagens*, mittels der *Pauly*-Reaktion und durch UV.-Licht (254 nm).

³⁾ Aromatisch substituierte Carbodiimide, wie Di-(*p*-tolyl)-carbodiimid, zeigen eine ausgeprägtere Fähigkeit zur Anlagerung von Aminen [7].

⁴⁾ Allerdings können unter diesen Bedingungen labile Schutzgruppen, wie die Tertiaryl- oder Benzylisopropoxyloxycarbonylgruppe abgespalten werden, vgl. z. B. [10].

NMR.-Spektren wurden bei 100 MHz auf dem *Varian* HA-100 Spektrometer aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen in ppm sind auf internes Tetramethylsilan bezogen. Für Aufnahmen und Diskussionen danken wir den Herren Drs. *G. Rist* und *H. Fuhrer* aus unserer Abteilung für Spektroskopie. Die Mikroanalysen stammen aus unserer Abteilung für Elementaranalyse (Dr. *W. Padowetz*).

1-(N,N'-Dicyclohexyl)-amidino-imidazol (1). Äquimolare Mengen Imidazol und DCCI wurden in Essigester während 6 Std. bei 50° gehalten; nach dem Abkühlen kristallisierte **1** (50%) aus. In DMF erfolgte die Addition unter Zusatz von Pyridinhydrochlorid schon bei Raumtemperatur. Smp. 135,5–8,5°; pK_a 7,2 (Titration in Methanol/Wasser 4:1).

$C_{16}H_{26}N_4$ (274,42) Ber. C 70,03 H 9,55 N 20,42% Gef. C 70,02 H 9,49 N 20,24%

Elektronenspektrum (Cyclohexan): keine spezifische Maxima, ϵ_{210nm} $1,2 \cdot 10^4 l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ (Imidazol: $3 \cdot 10^3$), Absorption bis 260 nm. – NMR. (DMSO- d_6): 0,8–2,0, H (Cyclohexyl); 3,1 *m*, H–C(1) (Cyclohexyl); 5,9 *b*, H–N (Amidin); 6,88 und 7,05 bei 100° schmal, bei RT. breit; H–C(4,5) (Imidazol); 7,53 *s*, H–C(2) (Imidazol). – NMR. (CDCl₃): 6 Imidazolprotonensignale bei RT. – NMR. (Toluol- d_6): 3 Imidazolprotonensignale bei RT., 6 Signale bei –50°. – Die Integration entspricht den erwarteten Werten.

N α -t-Butyloxycarbonyl-N i m-(N,N'-dicyclohexyl)-amidino-histidinmethylester (4 und 5). Die Darstellung erfolgte analog zu derjenigen von **1**. Die Abtrennung von nicht umgesetztem Ausgangsmaterial gelang durch Chromatographie an einer Kieselgel(*Merck*)-Säule mit Benzol/Aceton 1:1. Dabei wurden 30% eines Gemisches (*ca.* 3:1) von **4** und **5** isoliert. DC. (Benzol/Aceton 1:1): **4**: Rf 0,35; **5**: Rf 0,27.

$C_{25}H_{41}N_5O_4$ Ber. C 63,13 H 8,69 N 14,72 O 13,46%
(475,63) Gef. „ 63,28 „ 8,65 „ 14,30 „ 13,51%

NMR. (DMSO- d_6): 1,0–1,9, H (Cyclohexyl); 1,34 *s*, *t*-Butyl; 2,9 *d*, –CH₂–; 3,58 *s*, –OCH₃; 4,2 *m*, CH–CO–; 6,4 *b*, H–N (Amidin); 6,77 *d*, –CONH–; *ca.* 7,5, 2 Signale (3:1), H–C(2) (Imidazol); *ca.* 6,8, 2 Signale (3:1), H–C(4 und 5) (Imidazol). – Die Integration entspricht den erwarteten Werten.

Zur Identifizierung der Isomeren wurde bei 2,9 ppm eingestrahlt, die Ringprotonenkopplungskonstanten gemessen und nach [1] zugeordnet: **4** (Hauptkomponente, τ -Isomer): 7,58, H–C(2); 6,95, H–C(5), $J_{2,5} = 1,2$ Hz. – **5** (π -Isomer): 7,53, H–C(2); 6,72, H–C(4), $J_{2,4} < 1$ Hz.

N-Benzoyloxy-carbonyl-valyl-N i m-(N,N'-dicyclohexyl)-amidino-histidin-methylester (6). Der Verlauf der Addition von Z–Val–His–OCH₃ an DCCI unter den in Tab. 1 angegebenen Bedingungen wurde dünn-schichtchromatographisch verfolgt (Benzol/Aceton 1:1). Eine Probe wurde an einer Kieselgelsäule mit Benzol/Aceton 1:1 aufgetrennt und **6** als dünn-schichtchromatographisch einheitliche Verbindung isoliert. Es war nicht zu entscheiden, ob die beiden zu erwartenden Isomeren in den verwendeten Fließmitteln nicht aufgetrennt werden konnten, oder ob nur eine Komponente entstanden war.

Spaltung der Amidino-imidazole mit Methanol oder Wasser. **1** wurde in Methanol nach 2 Std. unter Rückfluss (*ca.* 64°) vollständig zu Imidazol und **2** (durch DC.-Vergleich identifiziert) gespalten. Bei Zusatz von 1 Äqu. Pyridinhydrochlorid erfolgte die Spaltung innerhalb 15 Min. Mit Methanol/2*N* Essigsäure 4:1 bildete sich DCH. Auf die gleiche Weise konnten die Derivate **4**, **5** und **6** gespalten werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *H. R. Matthews & H. Rapoport*, J. Amer. chem. Soc. **95**, 2297 (1973).
- [2] IUPAC-IUB (Recommendation 1971), Biochemistry **11**, 1726 (1972).
- [3] *W. König & R. Geiger*, Chem. Ber. **103**, 788 (1970).
- [4] *R. H. Andreatta et al.*, Helv. **56**, 470 (1973).
- [5] *E. Schmidt & F. Moosmüller*, Liebigs Ann. Chem. **597**, 235 (1955).
- [6] *J. G. Moffat & H. G. Khorana*, J. Amer. chem. Soc. **83**, 649 (1961).
- [7] *M. Szeherke & J. Csazar*, Ann. Univ. Sci. Budapest, Rolando Eötvös Nominatae Sect. Chim. **1**, 136 (1959); Ref.: Chem. Abstr. **56**, 4591 (1962).
- [8] *F. Micheel & M. Lorenz*, Liebigs Ann. Chem. **698**, 242 (1966).
- [9] *E. Ohisuka, S. Morioka & M. Ikehara*, J. Amer. chem. Soc. **94**, 3229 (1972).
- [10] *H. Klostermeyer & E. Schwertner*, Peptides 1972, North Holland Publishing Company, Amsterdam 1973, p. 108.