

ZUR ANWENDUNG VON 1-HYDROXYBENZOTRIAZOL IN DER PEPTIDSYNTHESE

Bahram Hemmasi und Ernst Bayer

Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen, W. Germany

(Received in Germany 11 March 1977; received in UK for publication 28 March 1977)

N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) ist eines der meist verwendeten Kupplungsreagenzien in der Peptidsynthese<sup>1</sup>. Die Carbonsäuren reagieren mit Carbodiimiden zu den reaktiven Zwischenprodukten, den O-Acylisoharnstoffderivaten<sup>2, 3</sup>, die nur mit einer weiteren Aminogruppe die Amidverbindung bilden. Außer den Carbonsäuren sind auch Phenole sauer genug, um mit Carbodiimiden unter Bildung von O-Arylisoharnstoffäther<sup>4</sup> zu reagieren. Alkohole reagieren unter milden Bedingungen nicht mit Carbodiimiden, sondern nur bei hohen Temperaturen<sup>5</sup> oder in Gegenwart von Katalysatoren<sup>6, 7</sup>.

Es wurde vermutet, daß Peptidkupplungen mit DCC Racemisierung<sup>8, 9</sup> verursachen und diese unterdrückt werden kann, wenn die Reaktion in Gegenwart von 1-Hydroxy-1, 2, 3-Benzotriazol<sup>10</sup> (HOBt) durchgeführt wird, wobei die Kupplungsausbeute verbessert werden soll<sup>8</sup>. Man vermutet, daß HOBt mit O-Acylisoharnstoff einen aktiven Ester bildet, welcher wiederum mit der Aminogruppe reagiert<sup>8</sup>. HOBt ist zur Veresterung der C-terminalen Aminosäure mit Polyäthylenglykol (PEG) in der Liquid-Phase Peptidsynthese<sup>11</sup> verwendet worden<sup>12</sup>.

Dieses Verfahren haben wir auch für die Synthese von PEG-Acylaminosäureestern angewandt, indem der HOBt-Ester einer Acylaminosäure in THF-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> mit PEG am Rückfluß für 2-7 Tage erhitzt wurde. Wir beobachteten, daß PEG-Acylaminosäureester, die nach dieser Methode hergestellt wurden, eine sehr hohe UV-Absorption zeigten und daß die UV-Spektren dieser Produkte denen von HOBt sehr ähnlich waren. Trotz weiterer Reinigung dieser Substanzen durch wiederholtes Umkristallisieren bzw. Chromatographie an Sephadex LH-20 wurde die UV-Absorption nicht vermindert. Das bedeutet, daß HOBt in PEG kovalent gebunden ist. Es wäre möglich, daß während der Veresterung HOBt mit der freien Hydroxylgruppe von PEG zu

einer Ätherverbindung reagiert, analog der Ätherbildung zwischen Phenolen und Alkoholen in Gegenwart von DCC<sup>13-15</sup>. Um das Auftreten einer solchen Reaktion besser zu demonstrieren, wurde der Bis(benzotriazoläther) von Polyäthylenglykol (III, PEG-OBt) wie folgt synthetisiert: Eine äquimolare Menge von HOBt (I) und DCC wurde in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -THF<sup>16</sup> aufgelöst, dazu gab man PEG (II, MG = 2000 und 10000) und erhitzte das ganze am Rückfluß für ca. 68 Std. . Nach einigen Stunden fiel ein weißer Niederschlag aus, welcher als N,N'-Dicyclohexylharnstoff (DCH, IV) identifiziert wurde.

Das Polymer war nach Isolierung und wiederholter Umkristallisation dünnschichtchromatographisch einheitlich. Die Elementar-Analyse dieser Substanz zeigte, daß die Hydroxylgruppe des PEG bis zu 93%<sup>17</sup> mit HOBt reagiert hatte. Wurde die Reaktion in Gegenwart von Pyridin durchgeführt, erhielt man eine geringere Ausbeute. Dies ist wahrscheinlich auf die Entfernung eines Protons von HOBt durch Pyridin zurückzuführen. Die Verbindung zeigte ein UV-Spektrum ähnlich dem des HOBt;  $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_2\text{Cl}_2, 0.2\% \text{ THF}}$  283 nm ( $\epsilon = 7738$ ), 263 nm ( $\epsilon = 10554$ ) und 257.5 nm ( $\epsilon = 10812$ ). Für HOBt  $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_2\text{Cl}_2, 0.2\% \text{ THF}}$  283 nm ( $\epsilon = 3800$ ), 264 nm ( $\epsilon = 4550$ ) und 260 nm (Schulter,  $\epsilon = 4400$ ).

<sup>1</sup>H n. m. r. (CDC<sub>3</sub>) zeigte Absorption bei  $\delta = 2.66$  (s, PEG Protone) und  $\delta = 7.65-8.05$  (m, OBt Protone) ppm. IR,  $\gamma_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  zeigte Absorption im aromatischen CH-Bereich bei 782, 769, 784  $\text{cm}^{-1}$ .

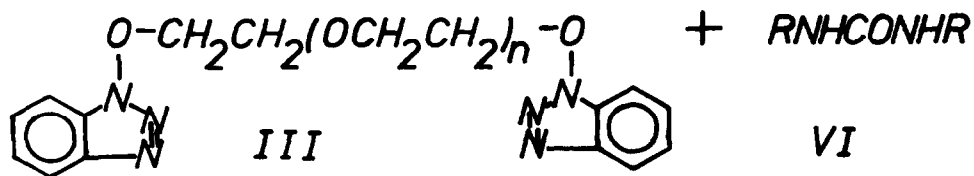
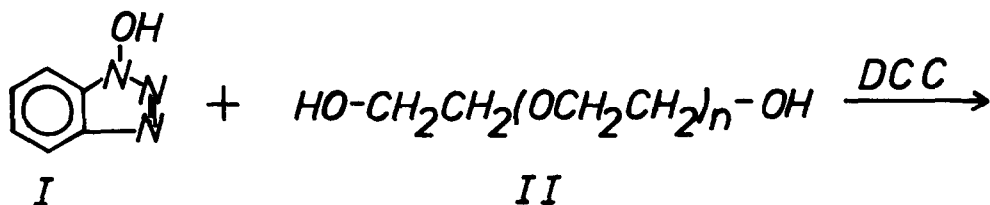
Der molare Extinktionskoeffizient von PEG-OBt zeigt, daß an ein PEG-Molekül zwei HOBt-Moleküle gebunden sind. Die Gegenwart von PEG ändert nicht die Position des ersten Maximums (283 nm) von HOBt und seinen  $\epsilon$ -Wert. Das zweite und dritte Maximum sind aber zu einer kürzeren Wellenlänge verschoben bei einer geringen Erhöhung der Intensität.

Für die Synthese von Arylalkyläthern wurden zwei verschiedene Reaktionsmechanismen vorgeschlagen<sup>13, 15</sup>. Beim ersten Mechanismus wird zunächst ein Phenol-DCC-Addukt gebildet (O-Phenylisoharnstoffäther), das von einem primären Alkohol angegriffen wird<sup>13</sup>. Im zweiten Mechanismus reagieren vermutlich die Alkohole anfänglich mit DCC, um O-Alkylisoharnstoffäther zu bilden, die dann von Phenolen angegriffen werden ( $\text{S}_{\text{N}2}$ -Substitution)<sup>15</sup>.

Um den möglichen Reaktionsmechanismus in unseren Untersuchungen zu demonstrieren, wurde O-Äthyl-N,N'-dicyclohexylisoharnstoffäther in reiner Form hergestellt<sup>7</sup>. Wurde diese

Verbindung mit HOBT in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : THF (1 : 1) am Rückfluß erhitzt, fiel Dicyclohexylharnstoff aus und 1-Äthoxybenzotriazol wurde in hoher Ausbeute gebildet. O-Äthyl-N,N'-dicyclohexylisoharnstoffäther reagierte auch mit Phenol unter den gleichen Bedingungen und ergab DCH und Äthylphenyläther. Andererseits reagierte O-Phenyl-N,N'-dicyclohexylisoharnstoffäther nicht mit Äthanol in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  am Rückfluß. Diese Experimente zeigen, daß die Ätherbildung über den zweiten Mechanismus erfolgt. Der zweite Mechanismus wird auch durch Einsatz von  $^{18}\text{O}$ -markiertem Äthanol unterstützt, wobei markierter DCH, aber unmarkierter Arylalkyläther gebildet wird<sup>15</sup>. In Abwesenheit eines Katalysators reagiert Äthanol nicht mit DCC in kochendem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Daher dürfte die intermediäre Bildung von O-Alkylisoharnstoffäther wahrscheinlich durch HOBT katalysiert werden, welches annähernd so sauer wie Eisessig ist<sup>18</sup>. Es wurde auch gezeigt, daß die O-Alkylisoharnstoffäther durch saure Katalyse aus Alkoholen und DCC erhalten werden können<sup>6</sup>.

Es ist offensichtlich, daß Acylaminosäure-OBT-Ester nicht ohne signifikante Nebenreaktion hergestellt werden können, wenn eine Kupplungskomponente oder eine Verbindung mit freien Hydroxylgruppen eingesetzt wird.



## Literatur und Notizen

1. J. C. Sheehan und G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 1067 (1955).
2. H. G. Khorana, *Chem. Rev.*, 53, 145 (1953).
3. M. Smith, J. C. Moffatt und H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 6204 (1958).
4. M. Busch, G. Blume und E. Pungs, *J. Prak. Chem.*, (2), 79, 513 (1909).
5. F. Lengfeld und J. Stieglitz, *Chem. Ber.*, 27, 926 (1894).
6. J. G. Moffatt und H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 3741 (1957);  
H. G. Khorana, *Can. J. Chem.*, 32, 231 (1954).
7. E. Schmidt und F. Moosmüller, *Ann.*, 597, 235 (1956).
8. W. König und R. Geiger, *Chem. Ber.*, 103, 788 (1970).
9. F. Weygand, D. Hoffmann und E. Wünsch, *Z. Naturforsch.*, 21b, 426 (1966).
10. E. Müller und G. Zimmermann, *J. Prak. Chem.*, (2), 111, 272 (1925).
11. E. Bayer und M. Mutter, *Nature*, 237, 512 (1972);  
M. Mutter und E. Bayer, *Angew. Chem.*, 86, 101 (1974).
12. W. Stein, (1976); I. Gatfield, (1975) und M. Schattenberg (1975),  
Dissertationen, Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen.
13. E. Vowinkel, *Chem. Ber.*, 95, 2997 (1962).
14. E. Vowinkel, *Angew. Chem.*, 75, 377 (1963).
15. F. L. Flach, *J. Org. Chem.*, 30, 1300 (1965).
16. HOBT ist in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  unlöslich. Daher wird es gewöhnlich in THF gelöst und dann mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gemischt. Wir haben jedoch die Erfahrung gemacht, daß man sofort eine klare Lösung erhält, wenn man DCC zu einer Suspension von HOBT in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gibt.
17. Angenommen, daß das MG von PEG genau 2000 ist, wurde mit Ausnahme der UV-Spektren für alle anderen Messungen nur das PEG-OBt 2000 benutzt.
18. G. Wandlberger, *Houben-Weyl Methoden der Organischen Chemie*, Bd. 15/1, E. Müller ed., S. 22, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.