

Wolfgang König und Rolf Geiger

Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolen

Aus den Farbwerken Hoechst AG, vormals Meister Lucius & Brüning, Frankfurt a. M.-Höchst
(Eingegangen am 25. September 1969)

1-Hydroxy-benzotriazol sowie verschiedene kernsubstituierte 1-Hydroxy-benzotriazole eignen sich als Zusätze bei der Dicyclohexylcarbodiimid-Methode¹⁾ zur Synthese von Peptiden. Ihr Einfluß auf die Racemisierung bei Peptidsynthesen wurde unter Anwendung des gaschromatographischen Racemisierungstests von Weygand u. Mitarbb.²⁾ untersucht. Die neuen Zusätze senken die Racemisierung, verhindern die *N*-Acyl-harnstoffbildung und führen in hoher Ausbeute zu sehr reinen Peptiden.

A New Method for Synthesis of Peptides: Activation of the Carboxyl Group with Dicyclohexylcarbodiimide using 1-Hydroxybenzotriazoles as Additives

1-Hydroxybenzotriazole and a number of substituted 1-hydroxybenzotriazoles are suitable additives in the synthesis of peptides using the dicyclohexylcarbodiimide method¹⁾. The glc-racemisation test described by Weygand and coworkers²⁾ was used to determine the influence of these additives on the racemisation during peptide synthesis. The newly employed additives decrease racemisation, prohibit the formation of *N*-acylurea and afford peptides in excellent yield and a high state of purity.

Zur racemisierungsfreien Verknüpfung von Peptiden wird neuerdings neben der Azid-Methode³⁾ in steigendem Maße die Dicyclohexylcarbodiimid/*N*-Hydroxy-succinimid-Methode⁴⁾ verwendet. Nach Gross und Bilk⁵⁾ entsteht aus *N*-Hydroxy-succinimid und Dicyclohexylcarbodiimid der Succinimidooxycarbonyl- β -alanin-[*N*-hydroxy-succinimidester], der mit Aminen zu Succinimidooxycarbonyl- β -alanin-amiden bzw. zu Harnstoffderivaten des β -Alanins reagiert. Auch Weygand und Mitarbb.⁶⁾ isolierten bei der Umsetzung von *N*-tert.-Butyloxycarbonyl-L-glutaminsäure- α -benzylester mit 2.4.6-Trimethoxy-benzylamin nach der Dicyclohexylcarbodiimid/*N*-Hydroxy-succinimid-Methode *N*-[Succinimidooxycarbonyl]- β -alanin-[2.4.6-trimethoxy-benzylamid]. Diese Tendenz zur Bildung von Nebenprodukten bewog uns, nach neuen Zusätzen zu suchen, die in Verbindung mit Dicyclohexylcarbodiimid ebenfalls die Racemisierung senken und dabei reinere Produkte liefern.

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

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

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

4) F. Weygand, D. Hoffmann und E. Wünsch, Z. Naturforsch. 21b, 426 (1966); E. Wünsch und F. Drees, Chem. Ber. 99, 110 (1966).

5) H. Gross und L. Bilk in E. Bricas: Peptides, North Holland Publishing Comp. 1968, 156; Tetrahedron [London] 24, 6935 (1968).

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

Tab. 1. Racemisierung bei der Dicyclohexylcarbodiimid-Methode unter Zusatz verschiedener 1-Hydroxy-benzotriazole (Synthese von Boc-Leu-Phe-Val-OBu^t aus Boc-Leu-Phe-OH und HCl·Val-OBu^t + *N*-Äthyl-morpholin)

Äquivv.	Zusatz ⁷⁾	Lösungs- mittel	% D-Phe-t.-Val
	kein Zusatz	THF	8.1
	kein Zusatz	DMF	14.3
	kein Zusatz	DMSO	14.9
	kein Zusatz	Pyridin	19.2
2	1-Hydroxy-benzotriazol ⁸⁾	THF	< 1.0
1.2	1-Hydroxy-benzotriazol	DMF	< 1.0
2	1-Hydroxy-benzotriazol	DMF	1.7
1	1-Hydroxy-benzotriazol	DMSO	2.0
1	1-Hydroxy-benzotriazol	Pyridin	1.7
2	6-Nitro-1-hydroxy-benzotriazol ⁹⁾	DMF	< 1.0
1	6-Nitro-1-hydroxy-benzotriazol	DMF	< 1.0
2	5-Chlor-1-hydroxy-benzotriazol ¹⁰⁾	DMF	1.7
1	5-Chlor-1-hydroxy-benzotriazol	DMF	< 1.0
2	6-Chlor-1-hydroxy-benzotriazol ¹¹⁾	DMF	1.1
1	6-Chlor-1-hydroxy-benzotriazol	DMF	< 1.0
2	5,6-Dichlor-1-hydroxy-benzotriazol ¹²⁾	DMF	1.3
1	5,6-Dichlor-1-hydroxy-benzotriazol	DMF	< 1.0
2	6-Brom-1-hydroxy-benzotriazol ¹¹⁾	DMF	< 1.0
1	6-Brom-1-hydroxy-benzotriazol	DMF	< 1.0
2	1-Hydroxy-6-trifluormethyl-benzotriazol	DMF	< 1.0
2	1-Hydroxy-benzotriazol-sulfonsäure-(6)-amid ¹³⁾	DMF	< 1.0
1	1-Hydroxy-benzotriazol-sulfonsäure-(6)-amid	DMF	< 1.0
2	1-Hydroxy-benzotriazol-sulfonsäure-(6)-diäthylamid	DMF	< 1.0
1	1-Hydroxy-benzotriazol-sulfonsäure-(6)-diäthylamid	DMF	< 1.5
2	1-Hydroxy-benzotriazol-sulfonsäure-(6)-methylamid	DMF	< 1.0
1	1-Hydroxy-benzotriazol-sulfonsäure-(6)-methylamid	DMF	< 1.0
2	1-Hydroxy-benzotriazol-carbonsäure-(6)-amid	DMF	< 1.0
1	1-Hydroxy-benzotriazol-carbonsäure-(6)-amid	DMF	< 1.0
2	1-Hydroxy-6-methyl-benzotriazol ¹⁴⁾	DMF	< 1.0
1	1-Hydroxy-6-methyl-benzotriazol	DMF	< 1.0
2	1-Hydroxy-5-methyl-benzotriazol	DMF	< 1.0
1	1-Hydroxy-5-methyl-benzotriazol	DMF	< 1.0
2	1-Hydroxy-4-methyl-benzotriazol	DMF	< 1.0
1	1-Hydroxy-4-methyl-benzotriazol	DMF	< 1.0
2	1-Hydroxy-5,6-dimethyl-benzotriazol	DMF	1.3
1	1-Hydroxy-5,6-dimethyl-benzotriazol	DMF	< 1.0
2	1-Hydroxy-5-methoxy-benzotriazol	DMF	< 1.0
1	1-Hydroxy-5-methoxy-benzotriazol	DMF	< 1.0
2	1-Hydroxy-6-methoxy-benzotriazol	DMF	1.0
1	1-Hydroxy-6-methoxy-benzotriazol	DMF	1.6
2	1-Hydroxy-6-methyl-5-cyan-benzotriazol	DMF	< 2.0
1	1-Hydroxy-6-methyl-5-cyan-benzotriazol	DMF	< 1.0
2	4-Chlor-6-nitro-1-hydroxy-7-methyl-benzotriazol ¹⁵⁾	DMF	< 1.0
1	4-Chlor-6-nitro-1-hydroxy-7-methyl-benzotriazol	DMF	< 1.0
2	6-Nitro-1-hydroxy-4-methyl-benzotriazol ¹⁶⁾	DMF	< 2.0
1	6-Nitro-1-hydroxy-4-methyl-benzotriazol	DMF	< 1.0
2	6-Chlor-1-hydroxy-5-methyl-benzotriazol	DMF	< 1.0
1	6-Chlor-1-hydroxy-5-methyl-benzotriazol	DMF	< 1.0
2	6-Chlor-1-hydroxy-5-isopropyl-benzotriazol	DMF	1.4
1	6-Chlor-1-hydroxy-5-isopropyl-benzotriazol	DMF	< 1.0
2	4,5,6,7-Tetrachlor-1-hydroxy-benzotriazol ¹⁷⁾	DMF	1.4

⁷⁾ Angaben zur Herstellung der Verbindungen und die Beschreibung neuer Derivate (Tab. 8) finden sich im Versuchsteil.

⁸⁾ R. Nietzki und E. Braunschweig, Ber. dtsh. chem. Ges. **27**, 3381 (1894).

Solche Zusätze für die Dicyclohexylcarbodiimid-Methode wurden in den leicht zugänglichen 1-Hydroxy-benzotriazolen⁷⁻¹⁷⁾ gefunden. Wie Tab. 1 zeigt, senken die meisten dieser Verbindungen die Racemisierung unter 1%.

Zur Ermittlung der Racemisierung wurde der gaschromatographische Racemisierungstest nach *Weygand* und Mitarbb.²⁾ herangezogen. Der Test wurde dahingehend abgeändert, daß man anstelle von *Z*-Leu-Phe-OH Boc-Leu-Phe-OH mit Val-OBu¹ kondensiert. Das entstehende Boc-Leu-Phe-Val-OBu¹ kann ohne vorherige Abspaltung der Schutzgruppen sofort mit 8.5*n* methanolischer Salzsäure hydrolysiert werden, während die Benzoyloxycarbonyl-Gruppe unter den Bedingungen der Hydrolyse störende Nebenprodukte bildet und vorher abgespalten werden muß.

Bei der Voraktivierung der Carboxylgruppe von Peptiden mit 1-Hydroxy-benzotriazolen und Dicyclohexylcarbodiimid ist jedoch, wie Tab. 2 zeigt, mit etwas Racemisierung zu rechnen. Im entsprechenden Racemisierungstest läßt man Boc-Leu-Phe-OH, ein 1-Hydroxy-benzotriazol und Dicyclohexylcarbodiimid eine Stunde bei 0° und eine Stunde bei Raumtemperatur miteinander reagieren (Herstellung von Boc-Leu-Phe-[1-hydroxy-benzotriazolester]) und gibt erst dann Valin-tert.-butylesterhydrochlorid und *N*-Äthyl-morpholin zu. Nach einer weiteren Stunde Reaktionszeit bei Raumtemperatur wird aufgearbeitet.

Tab. 2. Racemisierung bei der Voraktivierung von Boc-Leu-Phe-OH mit Dicyclohexylcarbodiimid und 1-Hydroxy-benzotriazolen und anschließender Umsetzung mit HCl·Val-OBu¹ + *N*-Äthyl-morpholin (Lösungsmittel: Dimethylformamid)

Äquivv.	Zusatz	% D-Phe-L-Val
2	1-Hydroxy-benzotriazol ⁸⁾	9.3
1	1-Hydroxy-benzotriazol	4.4
1	1-Hydroxy-4-methyl-benzotriazol	8.4
1	1-Hydroxy-5-methyl-benzotriazol	7.1
1	1-Hydroxy-5.6-dimethyl-benzotriazol	2.75
1	1-Hydroxy-5-methoxy-benzotriazol	2.4
1	6-Nitro-1-hydroxy-benzotriazol ⁹⁾	8.0
1	5-Chlor-1-hydroxy-benzotriazol ¹⁰⁾	4.8
1	5.6-Dichlor-1-hydroxy-benzotriazol ¹²⁾	6.8
1	1-Hydroxy-benzotriazol-sulfonsäure-(6)-amid ¹³⁾	4.2
1	1-Hydroxy-benzotriazol-carbonsäure-(6)-amid	3.6
1	1-Hydroxy-benzotriazol-sulfonsäure-(6)-methylamid	3.8
1	1-Hydroxy-benzotriazol-sulfonsäure-(6)-diäthylamid	5.1
1	1-Hydroxy-6-trifluormethyl-benzotriazol	3.5
1	1-Hydroxy-6-methoxy-benzotriazol	4.1

Wie Tab. 1 zeigt, genügen die 1-Hydroxy-benzotriazole als Zusätze für die Peptidsynthese mit Dicyclohexylcarbodiimid den Forderungen nach einer racemisierungsarmen Methode. Daß die Mehrzahl der Zusätze auch bei der Darstellung von

⁹⁾ *Th. Curtius* und *M. Mayer*, J. prakt. Chem. [2] **76**, 374 (1907).

¹⁰⁾ *E. Müller* und *G. Zimmermann*, J. prakt. Chem. [2] **111**, 272 (1925).

¹¹⁾ *J. Booy* und *J. W. Dienske*, Recueil Trav. chim. Pays-Bas **45**, 449 (1926).

¹²⁾ *E. Müller* und *W. Hoffmann*, J. prakt. Chem. [2] **111**, 294 (1925).

¹³⁾ *Eastman Kodak Co* (Erf. *Ch. F. H. Allen* und *A. Bell*), Amer. Pat. 2410619; C. A. **41**, 1245i (1947).

¹⁴⁾ *O. L. Brady* und *C. V. Reynolds*, J. chem. Soc. [London] **1928**, 200.

¹⁵⁾ *S. S. Joshi* und *D. S. Deorha*, J. Indian chem. Soc. **37**, 690 (1960).

¹⁶⁾ *O. L. Brady* und *J. N. E. Day*, J. chem. Soc. [London] **123**, 2258 (1923).

¹⁷⁾ *N. J. Leonard* und *K. Golankiewicz*, J. org. Chemistry **34**, 359 (1969).

Peptiden im präparativen Maßstab hinsichtlich Ausbeute und Reinheit der Reaktionsprodukte Vorteile bringt, zeigt Tab. 3 am Beispiel von Z-Val-Val-OMe.

Tab. 3. Synthese von Z-Val-Val-OMe nach der Dicyclohexylcarbodiimid-Methode unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolen (Eintopfmethode), Aufarbeitung nach Methode a (s. Versuchsteil); Lösungsmittel Tetrahydrofuran; es wurden jeweils 2 Äquivalente eines 1-Hydroxy-benzotriazols zugesetzt

Zusatz ⁷⁾	% Ausb.	Schmp.
ohne Zusatz	70.0	99–107°
1-Hydroxy-benzotriazol ⁸⁾	93.4	99–102°
1-Hydroxy-benzotriazol-sulfonsäure-(6)-diäthylamid	90.5	97–100°
1-Hydroxy-benzotriazol-sulfonsäure-(6)-methylamid	96.1	99–102°
1-Hydroxy-benzotriazol-sulfonsäure-(6)-amid ¹³⁾	90.5	100–102°
1-Hydroxy-6-trifluormethyl-benzotriazol	90.5	94–97°
1-Hydroxy-6-methoxy-benzotriazol	65.9	98–101°
1-Hydroxy-5-methoxy-benzotriazol	80.0	107–109°
1-Hydroxy-5,6-dimethyl-benzotriazol	98.8	98–100°
1-Hydroxy-4-methyl-benzotriazol	82.4	103–105°
1-Hydroxy-5-methyl-benzotriazol	79.6	104–105°
6-Nitro-1-hydroxy-benzotriazol ⁹⁾	90.6	93–95°
6-Chlor-1-hydroxy-benzotriazol ¹¹⁾	96.0	93–98°
5-Chlor-1-hydroxy-benzotriazol ¹⁰⁾	90.6	97–100°
5,6-Dichlor-1-hydroxy-benzotriazol ¹²⁾	93.3	93–97°
6-Brom-1-hydroxy-benzotriazol ¹¹⁾	90.5	100–102°
4-Chlor-6-nitro-1-hydroxy-7-methyl-benzotriazol ¹⁵⁾	80.0	96–99°
6-Chlor-1-hydroxy-5-methyl-benzotriazol	91.0	95–99°
1-Hydroxy-6-methyl-5-cyan-benzotriazol	66.0	103–106°

Tab. 4. Peptidderivate, hergestellt nach der Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxy-benzotriazol-Methode (Eintopfmethode)

Verbindung	Lösungs- mittel	Auf- arb. *)	Äquivv. 1-Hydroxy- benzotriazol	% Ausb.	Schmp.	[α] _D ²⁵
Z-Pro-Pro- \downarrow Ala-OBu ^{t20)}	DMF	a	2	84.5	Öl	
Z-Phe-Phe- \downarrow Val-Pro-Pro- Ala-OBu ^{t20)}	DMF	a	2	88	amorph	–126° (c = 2, MeOH)
Z-Phe-Phe-Pro-Pro-Phe- Phe- \downarrow Val-Pro-Pro-Ala-OBu ^{t20)}	DMF	a	2	91.4	amorph	
Z-Leu-Glu(OBu ^t)-OMe	THF	a	2	79	96–98°	–54.1° (c = 2, MeOH)
Z-Asn-Leu-OMe	DMF	b	2	85	176°	–26.3°
Z-Gln-Ala-OBu ^t	DMF	b	1	Lit. 21): 76 73.7	177–178° 158–161°	(c = 2, MeOH) –36.0°
				Lit. 22):	158–160°	–36.0°
Z-Ser-Gly-ONB	DMF	a	2	97.5 Lit. 23): 70	121–123° 121–123°	(c = 2, MeOH) –8.2° –8.5°
Z-Asn-Ala-OBu ^t	DMF	a	2	77	162–163°	(c = 2, Eisessig)
Z-Asn-Ser(Bu ^t)-OBu ^t	DMF	a	2	71	151–152°	+0.8°
Z-Asn-Asp(OBzl)-OBu ^t	DMF	a	2	91	132–134°	(c = 1, DMF) –10.8°
Z-Phe-Tyr-OMe	DMF	a	2	79.8 Lit. 24):	138–139° 137–138°	(c = 1, DMF)

\downarrow bedeutet Verknüpfungsstelle bei der Peptidsynthese.

*) S. Versuchsteil.

Z-Val-Val-OMe schmilzt laut Literatur bei 100–103°¹⁸⁾ bzw. 100–105°¹⁹⁾.

Für die weiteren Umsetzungen wurde das leicht zugängliche unsubstituierte 1-Hydroxy-benzotriazol verwendet, da die nur in schlechter Ausbeute herstellbaren kernsubstituierten Verbindungen keine wesentlichen Vorteile gegenüber der unsubstituierten Verbindung aufwiesen (Tab. 4).

Beim Aufbau der linearen Antamanidsequenz Z-Phe-Phe-Pro-Pro-Phe-Phe-Val-Pro-Pro-Ala-OBu^t²⁰⁾ wurden mit der neuen Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxy-benzotriazol-Methode durchweg bessere Ausbeuten erzielt als bei der bereits beschriebenen Synthese²⁰⁾.

Das neue Verfahren bewährte sich auch bei der Herstellung des Corticotropin-(1-23)-tricosipeptidamids analog der Vorschrift von Geiger und Mitarbb.²⁵⁾, die als Zusatz zum Dicyclohexylcarbodiimid 4-Nitro-phenol verwendeten. Etwas bessere Ausbeuten als 4-Nitro-phenol brachten später Pentachlorphenol²⁶⁾ oder *N*-Hydroxy-succinimid²⁷⁾. 1-Hydroxy-benzotriazol steigerte jedoch die Ausbeute gegenüber den genannten Zusätzen nochmals um etwa 15–20% d. Th.

Besondere Bedeutung gewinnt das neue Verfahren bei der Herstellung von Asparaginy- und Glutaminylpeptiden. Mit Dicyclohexylcarbodiimid als Kupplungsreagens ist am Glutamin und Asparagin schon wiederholt Dehydratisierung beobachtet worden²⁸⁾. Dabei entstehen Nitrile. Beim Asparagin wurde auch das Imid nachgewiesen. Deshalb lassen sich Asparaginy-peptide nach der Dicyclohexylcarbodiimid-Methode nur in Ausbeuten von 39–45% herstellen. Kürzlich wurden beim Versuch, den *N*-Hydroxy-succinimidester des Benzyloxycarbonyl-glutamins²⁹⁾ bzw. des *o*-Nitrophenylsulfenyl-glutamins³⁰⁾ herzustellen, die entsprechenden *N*-geschützten α -Amino-glutarimide isoliert. Wie Tab. 4 zeigt, lassen sich mit 1-Hydroxy-benzotriazol als Zusatz zur Dicyclohexylcarbodiimid-Methode die Asparaginy- und Glutaminyl-peptide in zum Teil sehr guten Ausbeuten und in reiner Form isolieren. Auch Serinpeptide mit freier OH-Gruppe, die noch häufig nach der Azid-Methode hergestellt werden, sind nach diesem neuen Verfahren leicht zugänglich.

Bei allen Versuchen ergab die dünnschichtchromatographische Überprüfung, daß die bei der Dicyclohexylcarbodiimid-Methode oft eintretende *N*-Acyl-harnstoff-Bildung³¹⁾ bei dieser neuen Methode ebenso unterbleibt wie beim Zusatz von *N*-Hydroxy-succinimid⁴⁾.

¹⁸⁾ J. W. Hinman, E. L. Caron und H. N. Christensen, J. Amer. chem. Soc. **72**, 1620 (1950).

¹⁹⁾ F. Weygand, W. König, R. Buyle und H. G. Viehe, Chem. Ber. **98**, 3632 (1965).

²⁰⁾ W. König und R. Geiger, Liebigs Ann. Chem. **727**, 125 (1969).

²¹⁾ R. B. Woodward, R. A. Olofson und H. Mayer, J. Amer. chem. Soc. **83**, 1010 (1961).

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

²³⁾ R. Schwyzer, H. Kappeler, B. Iselin, W. Rittel und H. Zuber, Helv. chim. Acta **42**, 1702 (1959).

²⁴⁾ H. J. Pannemann, A. F. Marx und J. F. Arens, Recueil Trav. chim. Pays-Bas **78**, 487 (1959).

²⁵⁾ R. Geiger, K. Sturm, G. Vogel und W. Siedel, Z. Naturforsch. **19b**, 858 (1964).

²⁶⁾ S. Bajusz, K. Medzihradsky, Z. Paulay und Zs. Lang, Acta chim. Acad. Sci. hung. **52**, 335 (1967).

²⁷⁾ W. Rittel in Adv. Exper. Med. Biology Vol. 2: Pharmacology of Hormonal Polypeptides and Proteins, S. 35, Plenum Press, New York, 1968.

²⁸⁾ Vgl. E. Schröder und K. Lübke, The Peptides, Vol. 1, S. 191, 202–204, Academic Press, New York und London, 1965.

²⁹⁾ H. Zahn und E. Th. J. Fölsche, Chem. Ber. **102**, 2158 (1969).

³⁰⁾ Ch. Meyers, R. T. Havran, J. L. Schwartz und R. Walter, Chem. and Ind. [London] **1969**, 316.

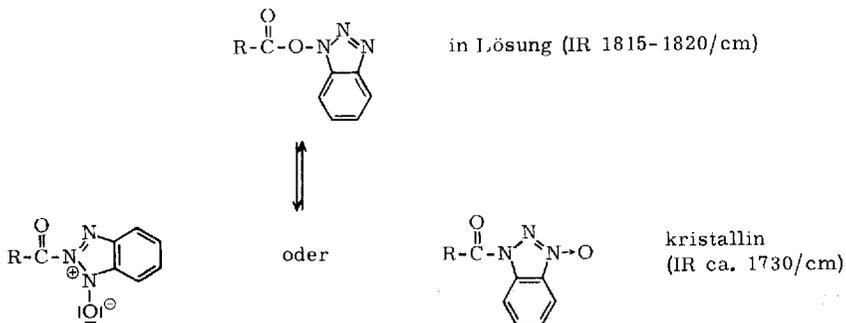
³¹⁾ Vgl. I. c. 28), S. 110.

Die *N*-geschützten Aminosäuren und Peptide werden mit 1-Hydroxy-benzotriazolen und Dicyclohexylcarbodiimid an der Carboxylgruppe aktiviert. Dabei entstehen 1-Hydroxy-benzotriazolester, die äußerst reaktionsfähig sind. Es ist bemerkenswert, daß bei den meisten kristallin isolierten 1-Hydroxy-benzotriazolestern die im IR nach hohen Wellenzahlen verschobene Carbonylbande erst in Lösung auftritt (Tab. 5). Die kristallinen Substanzen absorbieren dagegen etwa wie *N*-Acyl-benzotriazole. Nur der *Z*-Thr-[1-hydroxy-benzotriazolester] macht eine Ausnahme. Er hat auch im kristallinen Zustand den Charakter eines stark aktivierten Esters.

Tab. 5. IR-Carbonylschwingungen von isolierten Acylaminosäure-[1-hydroxy-benzotriazolestern] in cm^{-1}

Verbindung	KBr-Preßling	Lösung in Dioxan
<i>Z</i> -Gly-[1-hydroxy-benzotriazolester]	1715	1725
	1745	1820
<i>Z</i> -Phe-[1-hydroxy-benzotriazolester]	1685	1715
	1730	1815
<i>Z</i> -Phe-[1-hydroxy-5-methyl-benzotriazolester]	1690	1720
	1720	1820
<i>Z</i> -Thr-[1-hydroxy-benzotriazolester]	1685	1720
	1818	1818
1-Acetyl-benzotriazol	1735 ³²⁾	

Das bedeutet, daß je nach Aminosäurederivat entweder der aktivierte Ester oder ein Umlagerungsprodukt des Esters kristallin anfällt. Dieses Umlagerungsprodukt kann möglicherweise ein *N*-Acyl-benzotriazol-*N*-oxid sein, das sich in Lösung wieder in den aktivierten Ester umlagert.



Diese neuen aktivierten Ester reagieren mit primären und sekundären Aminen äußerst schnell. Bei der Synthese von *Z*-Phe-Val-OME aus *Z*-Phe-[1-hydroxy-benzotriazolester] und Valinmethylester-hydrochlorid unter Zusatz von einem Äquivalent *N*-Äthyl-morpholin waren bereits nach 5 Min. bei 0° über 90% Peptid gebildet. Unter den gleichen Bedingungen braucht z.B. der *Z*-Phe-[*N*-hydroxy-succinimidester]³³⁾ 1,5–2 Std., um 90% Peptid zu liefern.

³²⁾ H. A. Staab, W. Otting und A. Ueberle, Z. Elektrochem., Ber. Bunsenges. physik. Chem. **61**, 1000 (1957).

³³⁾ G. W. Anderson, J. E. Zimmerman und F. M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. **86**, 1839 (1964).

Bei dem Versuch, Z-Serin-[1-hydroxy-benzotriazolester] herzustellen, wurde in sehr guter Ausbeute das Z-Serin- β -lacton erhalten. Sheehan und Mitarbb.³⁴⁾ erhielten das N-Trityl-serin- β -lacton aus dem N-Trityl-serin mit Diisopropylcarbodiimid in 15 proz. Ausbeute.

Da die Kristallisation der aktivierten Ester oft auf Schwierigkeiten stößt, wird in der Regel auf die Isolierung verzichtet und die Lösung der aktivierten Ester zur Peptidsynthese verwendet.

Tab. 6. Synthese von Z-Val-Val-OMe durch Voraktivierung von Z-Val-OH mit Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxy-benzotriazolen, Aufarbeitung nach Methode a (s. Versuchsteil); Lösungsmittel Tetrahydrofuran; es wurde jeweils 1 Äquiv. eines 1-Hydroxy-benzotriazols zugesetzt

Zusatz	% Ausb.	Schmp.
1-Hydroxy-benzotriazol ⁸⁾	90.7	103 – 107°
1-Hydroxy-6-methoxy-benzotriazol	79.0	103 – 104°
1-Hydroxy-5-methoxy-benzotriazol	83.5	98 – 100°
1-Hydroxy-5.6-dimethyl-benzotriazol	93.3	102 – 103°
1-Hydroxy-4-methyl-benzotriazol	68.6	102 – 103°
1-Hydroxy-5-methyl-benzotriazol	71.5	104 – 105°

Tab. 6 (Synthese von Z-Val-Val-OMe) zeigt, daß auch bei der Voraktivierung ohne Isolierung der aktivierten Ester gute Ergebnisse erzielt werden können. Auch zur Voraktivierung wurde für weitere Versuche das unsubstituierte 1-Hydroxy-benzotriazol verwendet (Tab. 7).

Bei der Voraktivierung von Peptiden, die kein carboxylendständiges Glycin oder Prolin tragen, ist jedoch mit geringer Racemisierung zu rechnen (Tab. 2).

Tab. 7. Peptidderivate, hergestellt nach der 1-Hydroxy-benzotriazolester-Methode (Voraktivierung); Aufarbeitung a (s. Versuchsteil)

Verbindung	Lösungs- mittel	Äquiv. Zusatz	% Ausb.	Schmp.	$[\alpha]_D^{25}$
Z-Phe-Phe-OMe	THF	1	91	148–150°	– 17.95° (c = 2, DMF)
				Lit. ³⁵⁾ : 148–149°	– 17.5° (c = 2, DMF)
Z-Phe-Val-OMe	THF	1	83	111–113°	– 8.9° (c = 2, DMF)
Z-Pro-Pro- \downarrow Ala-OBu ^t 12)	DMF	1.1	94.1	Öl	
Z-Val- \downarrow Pro-Pro-Ala-OBu ^t 12)	THF	1.1	95	Öl	
Z-Pro-Val-OBu ^t	THF	1.1	78	114–115°	– 34.3° (c = 1, DMF)

\downarrow bedeutet Verknüpfungsstelle bei der Peptidsynthese.

³⁴⁾ J. C. Sheehan, K. Hasspacher und Y. L. Yeh, J. Amer. chem. Soc. **81**, 6086 (1959).

³⁵⁾ R. L. Huguenin und R. A. Boissonnas, Helv. chim. Acta **49**, 695 (1966).

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.

A) Prüfung auf Racemisierung bei der Dicyclohexylcarbodiimid-Methode unter Zusatz verschiedener 1-Hydroxy-benzotriazole

Herstellung neuer kernsubstituierter 1-Hydroxy-benzotriazole

Allgemeine Vorschriften

a) 0.1 Mol einer *aromatischen o-Chlor-nitro-Verbindung* werden in 50 ccm Äthanol mit 15 g (0.3 Mol) 100proz. *Hydrazinhydrat* 5 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Man kühlt und filtriert einen gegebenenfalls auftretenden Niederschlag ab, bzw. engt die Mutterlauge ein. Der Niederschlag bzw. der Rückstand wird in Wasser gelöst. Nach Extraktion mit Äther wird die wäbr. Phase mit konz. Salzsäure angesäuert und der Niederschlag abgesaugt. Ergebnisse s. Tab. 8.

b) 0.1 Mol einer *aromatischen o-Chlor-nitro-Verbindung* werden in 50 ccm Äthanol mit 15 g (0.3 Mol) 100proz. *Hydrazinhydrat* 10 Stdn. im Autoklaven auf 110° erhitzt. Aufarbeitung wie bei a). Ergebnisse s. Tab. 8.

c) 0.1 Mol einer *aromatischen o-Chlor-nitro-Verbindung* werden in 50 ccm Äthanol mit 27.2 ccm (0.2 Mol) *Triäthylamin* und 5 g (0.1 Mol) 100proz. *Hydrazinhydrat* 5 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Anschließend wird eingengt und der Rückstand wie bei a) aufgearbeitet. Ergebnisse s. Tab. 8.

Tab. 8. Neue kernsubstituierte 1-Hydroxy-benzotriazole

Verbindung (umkristallisiert aus)	Methode (Ausb.)	Schmp.	Summenformel (Mol.-Gew.)	Analysen			
				C	H	N	S
1-Hydroxy-6-trifluormethyl- benzotriazol (Wasser)	a (90%)	148—149°	C ₇ H ₄ F ₃ N ₃ O (203.1)	Ber. 41.39 Gef. 41.5	1.98 2.2	20.69 21.0	
1-Hydroxy-benzotriazol- sulfonsäure-(6)-methylamid (Wasser)	a (79%)	214°	C ₇ H ₉ N ₄ O ₃ S (228.2)	Ber. 36.85 Gef. 36.5	3.53 3.8	24.55 24.8	14.05 13.8
1-Hydroxy-benzotriazol- sulfonsäure-(6)-diäthylamid (Äthanol/Wasser)	a (67%)	159—160°	C ₁₀ H ₁₄ N ₄ O ₃ S (270.3)	Ber. 44.45 Gef. 44.7	5.22 5.1	20.73 20.8	11.84 11.7
1-Hydroxy-benzotriazol- carbonsäure-(6)-amid (50proz. Äthanol)	a (39%)	241°	C ₇ H ₆ N ₄ O ₂ ·1 H ₂ O (196.1)	Ber. 42.80 Gef. 42.7	4.11 4.0	28.58 28.6	
1-Hydroxy-5-methoxy- benzotriazol (Äthanol)	b (68%)	215°	C ₇ H ₇ N ₃ O ₂ (165.1)	Ber. 50.90 Gef. 50.9	4.27 4.2	25.45 25.7	
1-Hydroxy-6-methoxy- benzotriazol (Wasser)	b (6%)	172—173°	C ₇ H ₇ N ₃ O ₂ ·0.5 H ₂ O (174.1)	Ber. 48.30 Gef. 48.7	5.21 5.1	24.13 25.3	
1-Hydroxy-5-methyl- benzotriazol (Wasser)	b (77%)	188—189°	C ₇ H ₇ N ₃ O (149.1)	Ber. 56.37 Gef. 56.4	4.73 4.7	28.18 28.3	
1-Hydroxy-4-methyl- benzotriazol (Äthanol)	b (71%)	151.5—152.5°	C ₇ H ₇ N ₃ O (149.1)	Ber. 56.37 Gef. 56.4	4.73 4.8	28.18 28.0	
1-Hydroxy-5,6-dimethyl- benzotriazol (Äthanol)	b (60%)	193—194°	C ₈ H ₉ N ₃ O (163.2)	Ber. 58.89 Gef. 58.8	5.56 5.5	25.75 25.4	
1-Hydroxy-6-methyl-5-cyan- benzotriazol (Äthanol/Wasser)	b (17%)	216—217°	C ₈ H ₆ N ₄ O (174.2)	Ber. 55.17 Gef. 54.4	3.47 3.6	32.17 32.1	
6-Chlor-1-hydroxy-5-methyl- benzotriazol (Äthanol/Wasser)	c (37%)	215°	C ₇ H ₆ ClN ₃ O (183.6)	Ber. 45.78 Gef. 45.7	3.30 3.3	22.89 23.0	
6-Chlor-1-hydroxy-5-isopropyl- benzotriazol (Äthanol/Wasser)	c (25%)	173—174°	C ₉ H ₁₀ ClN ₃ O (211.7)	Ber. 51.05 Gef. 50.8	4.76 4.7	19.87 20.2	

Boc-Leu-Phe-OMe: Zu einer Lösung von 36 g (155 mMol) *Boc-Leu-OH* in 300 ccm absol. Tetrahydrofuran gibt man 41.8 g (310 mMol) *1-Hydroxy-benzotriazol*, 33.4 g (155 mMol) *HCl·Phe-OMe* und 19.9 ccm (155 mMol) *N-Äthyl-morpholin*. Man kühlt auf 0° und gibt unter Rühren eine Lösung von 33.7 g (163 mMol) *Dicyclohexylcarbodiimid* in 50 ccm eiskaltem Tetrahydrofuran dazu. Man rührt eine Stde. bei 0° und eine Stde. bei Raumtemperatur. Das Filtrat wird eingengt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und mit gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung, 2*n* Citronensäure, gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird mit Petroläther verrieben. Ausb. 53.2 g (88%), Schmp. 80–85°. Zur Reinigung wurde in Essigester über etwa 150 g basisches Al₂O₃ (Woelm, Akt.-St. I) chromatographiert. Ausb. 46.5 g (77%), Schmp. 91°, $[\alpha]_D^{20}$: -27.7° (*c* = 1, Methanol).

C₂₁H₃₂N₂O₅ (392.5) Ber. C 64.25 H 8.22 N 7.14 Gef. C 64.0 H 8.2 N 6.9

Boc-Leu-Phe-OH: Zu einer Lösung von 46.5 g (119 mMol) *Boc-Leu-Phe-OMe* in 190 ccm Dioxan gibt man 119 ccm 1*n* NaOH, läßt 2 Stdn. bei Raumtemp. rühren, neutralisiert mit einigen Tropfen 2*n* Citronensäure und engt i. Vak. ein. Der Rückstand wird bei 0° zwischen 200 ccm 2*n* Citronensäure und Essigester verteilt. Die Essigesterphase wird mit Wasser ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet und eingengt. Der Rückstand wird aus Essigester/Petroläther kristallisiert. Ausb. 42.3 g (94%), Schmp. 113–116°, $[\alpha]_D^{20}$: -8.5° (*c* = 2, Methanol).

C₂₀H₃₀N₂O₅ (378.5) Ber. C 63.48 H 7.99 N 7.40 Gef. C 63.5 H 8.0 N 7.3

Prüfung auf Racemisierung bei der „Eintopfmethode“

378.5 mg (1 mMol) *Boc-Leu-Phe-OH* und 209.7 mg (1 mMol) *HCl·Val-OBu^t* (durch Hydrieren von *Z*-Val-OBu^t³⁶⁾ bei gleichzeitiger Zugabe von methanolischer Salzsäure bei pH 4.5 hergestellt, Schmp. 148°) werden in ca. 2 ccm Lösungsmittel gelöst bzw. suspendiert. Dazu gibt man 0.12 ccm *N-Äthyl-morpholin* (knapp 1 mMol) und kühlt im Eisbad ab. Danach gibt man die Zusätze und zum Schluß eine auf 0° abgekühlte Lösung von 207 mg *Dicyclohexylcarbodiimid* (1 mMol) in 1 ccm Lösungsmittel zu. Man läßt die Ansätze 1–2 Stdn. bei 0° und etwa 1 Stde. bei Raumtemperatur stehen, verdünnt mit etwa 30 ccm Essigester, filtriert den ausgefallenen Niederschlag ab, schüttelt das Filtrat mit gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung, 2*n* Citronensäure, gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser aus, trocknet mit Natriumsulfat, engt ein und chromatographiert den Rückstand in Essigester über 3 g basisches Al₂O₃ (Woelm, Akt.-St. I). Das Eluat (etwa 40 ccm) wird eingengt und der Rückstand in etwa 5 ccm 8–9*n* methanol. *HCl* gelöst und im Bombenrohr 24 Stdn. auf 70° erhitzt. Die methanol. Salzsäure wird eingengt und der Rückstand nach l. c.²⁾ aufgearbeitet. Ergebnisse s. Tab. 1.

Prüfung auf Racemisierung bei der Voraktivierung von *Boc-Leu-Phe-OH* mit *Dicyclohexylcarbodiimid* und *1-Hydroxy-benzotriazolen*

Zu einer Lösung von 378.5 mg *Boc-Leu-Phe-OH* (1 mMol) und Zusatz in 2 ccm Dimethylformamid gibt man bei 0° eine eiskalte Lösung von 207 mg *Dicyclohexylcarbodiimid* (1 mMol) in 1 ccm Dimethylformamid und läßt eine Stde. bei 0° und eine Stde. bei Raumtemperatur stehen. Dann gibt man 209.7 mg *HCl·Val-OBu^t* (1 mMol) und 0.12 ccm *N-Äthyl-morpholin* (1 mMol) zu, läßt nochmals eine Stde. bei Raumtemperatur stehen und arbeitet wie oben auf. Ergebnisse s. Tab. 2.

Daten zur gaschromatographischen Diastereomerentrennung: Gearbeitet wurde an einer 100 m Kapillarsäule, belegt mit Polyphenyläther OS 138 (F. u. M Gerät, Typ 5750, FID, Arbeitstemp. 210° isotherm, Strömung 4 ccm He/Minute, Splitverhältnis 1/50–1/100).

³⁶⁾ G. W. Anderson und F. M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. **82**, 3359 (1960).

B) Synthese von Peptiden nach der Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxy-benzotriazol-Methode

1. „Eintopf-Methode“ (Tab. 4 und 9)

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 10–20 mMol eines *1-Hydroxy-benzotriazols* und bei 0° etwa 11 mMol einer *Dicyclohexylcarbodiimid*-Lösung. Man läßt nun 1 Stde. bei 0° und 1 Stde. bei Raumtemperatur stehen oder rühren und arbeitet wie folgt auf:

a) Der Niederschlag wird abgesaugt und das Filtrat i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen und mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung, 2*n* Citronensäure, Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingeengt. Der Rückstand wird mit Petroläther verrieben, geeignet umkristallisiert oder zur weiteren Reinigung über basisches Al₂O₃ (Woelm, Akt.-St. 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. Voraktivierung von *N-Acyl-aminosäuren* und *-peptiden* mit *Dicyclohexylcarbodiimid*/*1-Hydroxy-benzotriazol* und anschließende Umsetzung mit *Aminosäure-* oder *Peptid-estern* (Tab. 7 und 9)

Zu der Lösung von 10 mMol einer *N-Acyl-aminosäure* bzw. eines *N-Acyl-peptids* und 10 mMol eines *1-Hydroxy-benzotriazols* gibt man bei 0° 11 mMol *Dicyclohexylcarbodiimid*, läßt 1 Stde. bei 0° und 1 Stde. bei Raumtemperatur 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 Raumtemperatur stehen oder rühren und arbeitet wie bei 1. a) oder 1. b) auf.

Tab. 9. Analysen der neu hergestellten Verbindungen

Verbindung	Summenformel (Mol.-Gew.)	Analysen		
		C	H	N
Z-Ala-Leu-Glu(OBu ^t)-OMe	C ₂₇ H ₄₁ N ₃ O ₈ (535.6)	Ber. 60.54 Gef. 59.7	7.72 7.9	7.84 8.0
Z-Asn-Ala-OBu ^t	C ₁₉ H ₂₇ N ₃ O ₆ (393.4)	Ber. 58.00 Gef. 58.1	6.92 6.9	10.68 10.8
Z-Asn-Ser(Bu ^t)-OBu ^t	C ₂₃ H ₃₅ N ₃ O ₇ (465.5)	Ber. 59.33 Gef. 60.0	7.58 7.8	9.03 9.3
Z-Asn-Asp(OBzl)-OBu ^t	C ₂₇ H ₃₃ N ₃ O ₈ (527.6)	Ber. 61.47 Gef. 61.2	6.30 6.1	7.97 8.2
Z-Phe-Val-OMe	C ₂₃ H ₂₈ N ₂ O ₅ (412.5)	Ber. 66.97 Gef. 67.3	6.84 6.9	6.79 7.0
Z-Pro-Val-OBu ^t	C ₂₂ H ₃₂ N ₂ O ₅ (404.5)	Ber. 65.32 Gef. 65.2	7.97 8.3	6.93 7.1

Allgemeine Vorschrift zur Herstellung von N-Acyl-aminosäure-[1-hydroxy-benzotriazolestern] (Tab. 10): Zu einer auf 0° abgekühlten Lösung von 10 mMol einer *N-Acyl-aminosäure* und 10 mMol eines *1-Hydroxy-benzotriazols* in 30 ccm Tetrahydrofuran gibt man 11 mMol *Dicyclohexylcarbodiimid*, läßt 1 Stde. bei 0° und 1 Stde. bei Raumtemperatur rühren, saugt den Niederschlag ab, engt das Filtrat ein und verreibt den Rückstand mit Isopropylalkohol.

Tab. 10. Daten und Analysen der Z-Aminosäure-[1-hydroxy-benzotriazolester]

Verbindung	% Ausb.	Schmp.	Summenformel (Mol.-Gew.)	Analysen		
				C	H	N
Z-Phe-[1-hydroxy-benzotriazolester]	69.5	120—122°	C ₂₃ H ₂₀ N ₄ O ₄ (416.4)	Ber. 66.33 Gef. 66.3	4.84 4.9	13.46 13.6
Z-Gly-[1-hydroxy-benzotriazolester]	49	147°	C ₁₆ H ₁₄ N ₄ O ₄ (326.3)	Ber. 58.89 Gef. 58.0	4.32 4.2	17.17 17.4
Z-Thr-[1-hydroxy-benzotriazolester]	68	150—153°	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₅ (370.4)	Ber. 58.37 Gef. 58.4	4.9 5.2	15.13 15.3
Z-Phe-[1-hydroxy-5-methyl-benzotriazolester]	50	153—155°	C ₂₄ H ₂₂ N ₄ O ₄ (430.5)	Ber. 66.96 Gef. 67.2	5.15 5.0	13.02 13.1

N-Benzoyloxycarbonyl-L-serin-β-lacton: Zu einer Lösung von 2.4 g (10 mMol) *Z-Serin* und 1.5 g (11 mMol) *1-Hydroxy-benzotriazol* in 20 ccm absol. Tetrahydrofuran gibt man bei -10° eine Lösung von 2.2 g (11 mMol) *Dicyclohexylcarbodiimid* in 10 ccm absol. Tetrahydrofuran. Man läßt 1 Stde. bei 0° und 1 Stde. bei Raumtemperatur stehen, saugt den Niederschlag ab und engt das Filtrat ein. Der Rückstand wird mit Isopropylalkohol verrieben, abgesaugt und nochmals mit Isopropylalkohol aufgeköcht. Ausb. 2.0 g (91%), Schmp. 177—179°.

C₁₁H₁₁NO₄ (221.3) Ber. C 59.71 H 5.01 N 6.33 Gef. C 59.2 H 5.2 N 6.5

[367/69]