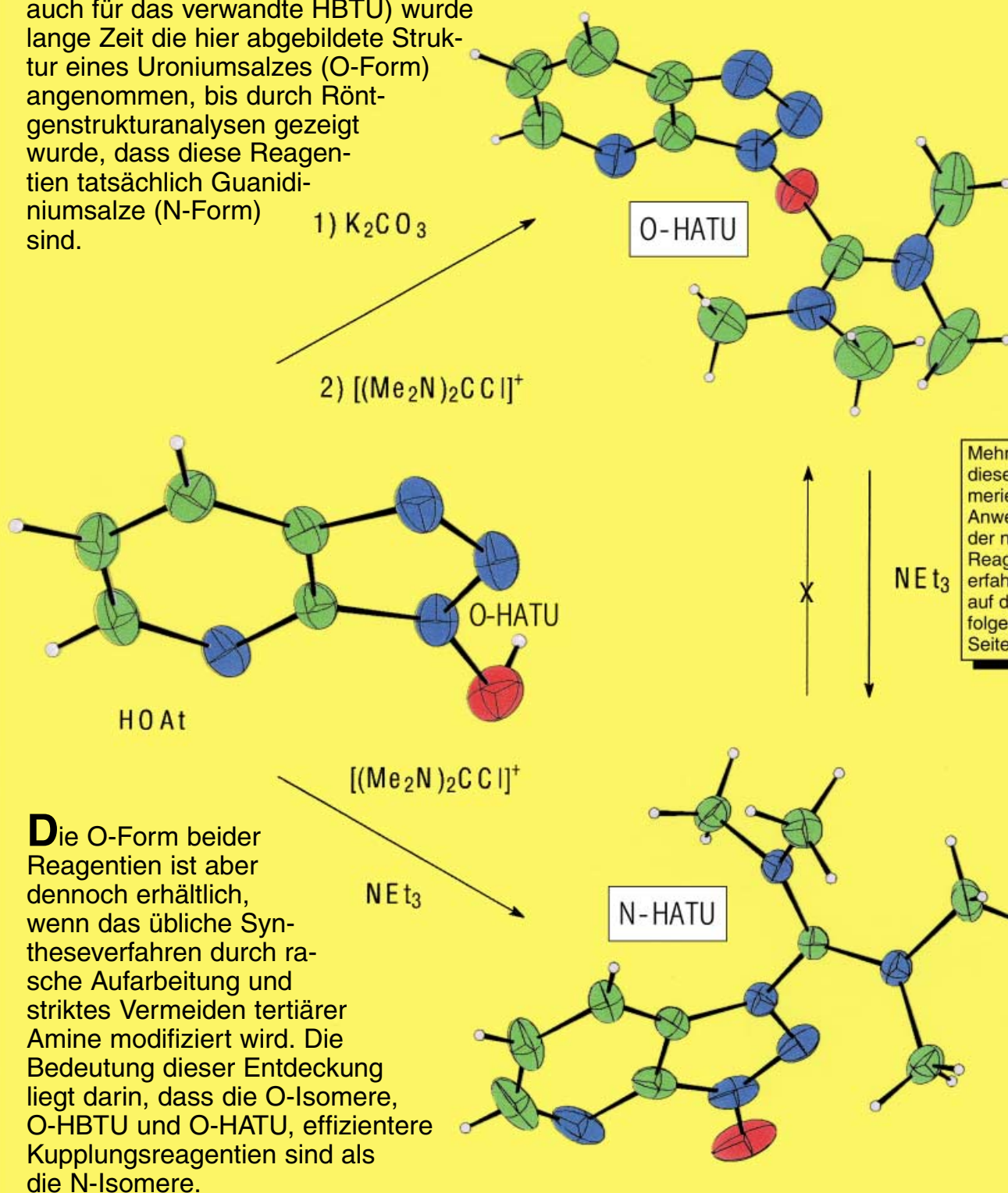


Für das Kupplungsreagens HATU (und auch für das verwandte HBTU) wurde lange Zeit die hier abgebildete Struktur eines Uroniumsalzes (O-Form) angenommen, bis durch Röntgenstrukturanalysen gezeigt wurde, dass diese Reagentien tatsächlich Guanidiniumsalze (N-Form) sind.

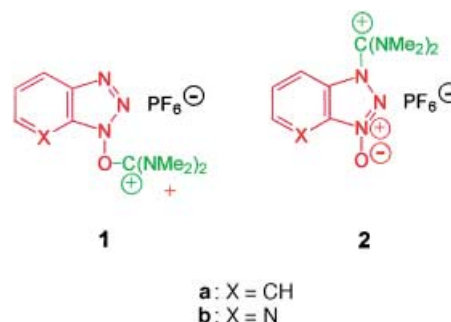


Die O-Form beider Reagentien ist aber dennoch erhältlich, wenn das übliche Syntheseverfahren durch rasche Aufarbeitung und striktes Vermeiden tertiärer Amine modifiziert wird. Die Bedeutung dieser Entdeckung liegt darin, dass die O-Isomere, O-HBTU und O-HATU, effizientere Kupplungsreagentien sind als die N-Isomere.

Kupplungsreagentien vom Uronium-/Guanidinium-Typ: Synthese und Charakterisierung der authentischen Uroniumsalze**

Louis A. Carpino,* Hideko Imazumi, Ayman El-Faham, Fernando J. Ferrer, Chongwu Zhang, Yunsub Lee, Bruce M. Foxman, Peter Henklein, Christiane Hanay, Clemens Mügge, Holger Wenschuh, Jana Klose, Michael Beyermann und Michael Bienert

Phosphoniumsalze^[1, 2] (BOP, PyBOP etc.) und Guanidiniumsalze^[3] (HBTU, HATU etc.) gehören gegenwärtig zu den am häufigsten verwendeten Kupplungsreagentien in der Peptidsynthese. Als HBTU 1978 erstmals beschrieben wurde, hat man für die Verbindung, wahrscheinlich in Analogie zu den bereits bekannten Phosphoniumsalzen, die Struktur eines Uroniumsalzes formuliert (**1a**). Wir haben 1993 die gleiche Synthesemethode auf die Herstellung von HATU angewendet^[4] und der Verbindung eine analoge Struktur zugeordnet (**1b**), obwohl die in beiden Publikationen^[3, 4] beschriebenen ¹H-NMR-Daten, die nach dem damaligen Wissensstand ausgewertet wurden,^[5] auch andere Möglichkeiten zugelassen hätten. Ein Jahr später ergaben Röntgenstrukturanalysen sowie NMR- und Festkörper-NMR-spektroskopische Untersuchungen, dass sowohl im kristallinen Zustand^[6] als auch in Lösung^[7, 8] die wahren Strukturen, in Übereinstimmung mit den erwarteten thermodynamischen Stabilitäten,^[9] nicht den Uroniumisomeren **1**, sondern den Guanidiniumisomeren **2** entsprechen.



Durch die Verwendung von KOBt^[10] und KOAt^[13] anstelle von HOBt und HOAt sowie eine schnelle Aufarbeitung der Reaktionsmischung ist es uns nun gelungen, diese Verbindungen in ihrer ursprünglich postulierten Uroniumform herzustellen. Dieses Ergebnis ist von besonderem Interesse, weil die neuen Uroniumsalze reaktiver als ihre Guanidiniumisomere sind. Zwar wurde das Vorliegen der Uroniumform zunächst durch Untersuchungen an einem Methyl-substituierten, von 4-Me-HOAt abgeleiteten HATU-Derivat^[8] nachgewiesen, bei dem der Methyl-Substituent die Stabilität der N-Form durch sterische Wechselwirkung beeinträchtigt, doch ist diese Substitution für die Isolierung der Uroniumform nicht erforderlich, wenn die leichte Isomerisierung der O- in die N-Form durch organische Basen wie Triethylamin verhindert wird. Dieser Prozess kann durch IR-Messungen (siehe unten) leicht verfolgt werden. Die umgekehrte Umlagerung ist nicht beobachtet worden. Durch Röntgenstrukturanalyse^[14] konnte schließlich bestätigt werden, dass sowohl HBTU als auch HATU in der O-Form vorliegen, wenn sie mit den Kaliumsalzen von HOBt und HOAt hergestellt werden (Abbildung 1).

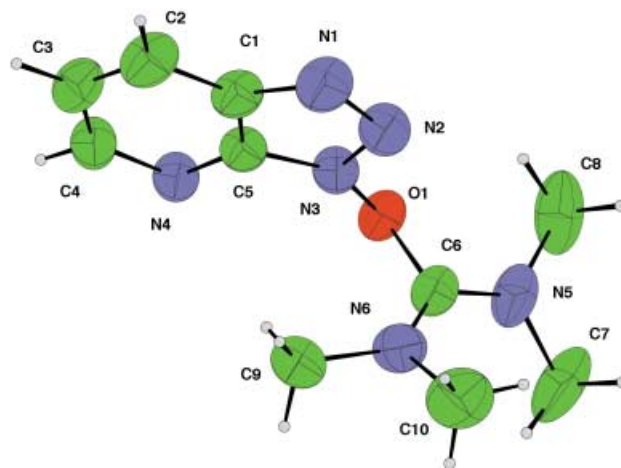


Abbildung 1. Molekülstruktur von **1b**.

Nach der erfolgreichen Synthese mehrerer Uroniumverbindungen und Strukturbestätigung durch Röntgenstrukturanalyse konnten wir charakteristische spektroskopische Eigenschaften ableiten, die nun eine einfache Strukturzuordnung auf der Basis von IR-, ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren ermöglichen (Tabelle 1). Die IR-Spektren von Salzen, die sich von Tetramethylharnstoff ableiten, zeigen charakteristische

[*] Prof. L. A. Carpino, Dr. H. Imazumi, Dr. A. El-Faham, Dr. F. J. Ferrer, Dr. C. Zhang, Y. Lee

Department of Chemistry, University of Massachusetts
Amherst, MA 01003-9336 (USA)

Fax: (+1) 413-545-4490

E-mail: carpino@chem.umass.edu

Prof. B. M. Foxman

Department of Chemistry, Brandeis University, Waltham (USA)

Dr. P. Henklein, Dr. C. Hanay

Institut für Biochemie, Humboldt-Universität
Berlin (Deutschland)

Dr. C. Mügge

Institut für Chemie, Humboldt-Universität
Berlin (Deutschland)

Dr. H. Wenschuh

Jerini Biotech GmbH, Berlin (Deutschland)

Dr. J. Klose, Dr. M. Beyermann, Prof. M. Bienert

Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie
Berlin (Deutschland)

[**] Die Untersuchungen an der University of Massachusetts wurden durch die National Institutes of Health (GM-09706) und die National Science Foundation (CHE9707651) gefördert, die Arbeiten an der Brandeis University durch die National Science Foundation (DMR 0089257) und die Arbeiten an der Humboldt-Universität sowie am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und den Fonds der Chemischen Industrie. Eine Liste verwendeter Abkürzungen findet sich vor dem Literaturverzeichnis.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Tabelle 1. IR-, ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Daten der N- und O-HXTU-Spezies.^[a]

Guanidinium-Typ				Uronium-Typ			
	IR [cm^{-1}]	^1H -NMR ^[b]	^{13}C -NMR ^[c]		IR [cm^{-1}]	^1H -NMR ^[b]	^{13}C -NMR ^[c]
N-HATU	1668.9	3.02s, 3.37s	151.9	O-HATU	1711.5	3.24s	162.2
N-4-Me-HATU	1670.4	3.02s, 3.48s	150.1	O-4-Me-HATU	1711.5	3.25s	161.9
N-4-Cl-HBTU	1675.6	3.00s, 3.44s	149.3	O-4-Cl-HBTU	1711.1	3.21s	161.7
N-HBTU	1664.4	3.02s, 3.37s	152.7	O-HBTU	1709.3	3.21s	162.0

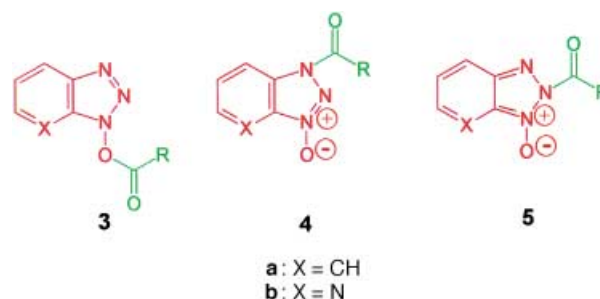
[a] Die IR-Messungen erfolgten in CH_3CN , die NMR-Messungen in CD_3CN . [b] Methylprotonen. [c] Kationisches Kohlenstoffatom.

Banden bei $1709\text{--}1711\text{ cm}^{-1}$ für O-Isomere und bei $1664\text{--}1675\text{ cm}^{-1}$ für N-Isomere. Die O-Derivate zeigen im ^1H -NMR-Spektrum ein Singulett für die zwölf Protonen der Dimethylaminogruppen bei $\delta = 3.24$, während die N-Isomere zwei Singulets für je sechs Protonen bei $\delta = 3.0$ und 3.4 aufweisen. Genau diese Unterschiede in den ^1H -NMR-Spektren sind zu erwarten, wenn man die Effekte einer eingeschränkten Rotation in ähnlichen Systemen^[5] berücksichtigt.

Wie erwartet (C-O- oder C-N-Bindungsspaltung)^[15] erfolgt die Aktivierung von Aminosäurederivaten durch die authentischen Uroniumsalze schneller als durch die isomeren Guanidinium-Spezies, vorausgesetzt, eine schnelle vorherige $\text{O} \rightarrow \text{N}$ -Umlagerung wird durch Wahl der Reaktionsbedingungen verhindert. So erfolgt die Umwandlung von Z-Aib-OH in Z-Aib-OAt mit O-HATU in Gegenwart von einem Äquivalent Collidin mit einer Halbwertszeit von weniger als 2 min, während für N-HATU unter identischen Bedingungen $t_{1/2}$ etwa 7 min beträgt. Für HBTU wurden $t_{1/2}$ -Werte von mehr als 1 h sowohl für das O- (40% OBt-Ester nach 1 h) als auch für das N-Isomer (29% OBt-Ester nach 1 h) bestimmt. Diese Unterschiede spiegeln sich auch beim Aufbau von Peptiden wider, z. B. bei der Synthese des Modelldecapeptids ACP nach dem so genannten „1.5 \times 1.5“-Verfahren.^[16] Hierbei werden bei Verwendung 1.5-molarer Überschüsse an Aminosäurederivat bereits nach 1.5 min Umsatzraten bestimmt, um Defizite von Kupplungsreagentien deutlicher aufdecken zu können. Die manuelle Festphasensynthese lieferte bei Aktivierung mit N-HATU 66.4% und bei Verwendung von O-HATU 81.2% des Zielpeptids im Rohprodukt.

Bei der Aktivierung und Kupplung von Peptidsegmenten bestimmt das Kupplungsreagens neben der Kupplungsausbeute auch den Grad der Epimerisierung. Die besten Ergebnisse wurden hier bei Aktivierungen in Gegenwart der Base TMP erzielt. So beträgt bei der [2+1]-Kupplung unter Bildung von Z-Phe-Val-Pro-NH₂,^[17] einer gut untersuchten Modellkupplung, die Epimerisierung in DMF bei Verwendung von TMP/DIEA (1:1) für O-HATU und N-HATU 3.4 bzw. 5.9%, für O- und N-HBTU 10.3 bzw. 20.6%. Wird dagegen ausschließlich DIEA verwendet, das eine schnelle Isomerisierung der O- in die N-Form bewirkt, so werden sowohl mit O-HATU als auch mit N-HATU 10% Epimerisierung beobachtet.

Unsere Ergebnisse zur Existenz von stabilen O- und N-Formen der Uronium-/Guanidiniumsalze erinnert an die Formulierung von Strukturen für O- und N-Acylisomere (**3** bzw. **4**), die während der Aktivierung einer Säure in Gegenwart von HOXt und einem Carbodiimid oder mittels HXTU in Gegenwart einer Base gebildet werden. Diese aktivierten Spezies werden seit der klassischen Arbeit von König und Geiger^[18] zum Nutzen von HOBt als Additiv bei Kupplungs-



reaktionen als die wichtigsten Intermediärprodukte bei Peptidkupplungen in Gegenwart von HOXt betrachtet. Ursprünglich wurde neben der O-Form **3a** und der N-Form **4a** noch eine zweite N-Acyl-Spezies **5a** postuliert. Während Beispiele für die Existenz von **3** und **4** in unterschiedlichen Systemen gefunden und durch Röntgenstrukturanalysen bestätigt werden konnten,^[19] fehlen für die Bildung der Struktur **5** eindeutige Beweise.

Durch IR-Untersuchungen des Aktivierungsprozesses konnten wir zeigen, dass die O-Form **3** sehr schnell gebildet wird und nachfolgend, in Abhängigkeit vom System und/oder dem Lösungsmittel, mehr oder weniger schnell zur N-Form isomerisiert. Da die anfangs gebildete O-Form reaktiver ist,^[20] könnte dies erklären, warum Peptidsynthesen effektiver verlaufen, wenn die Voraktivierung kurz gewählt wird („low preactivation“). Beispiele hierfür sind die Festphasensynthese der Jung-Redemann-Decapeptidsequenz^[21] mit N-HATU (51.4% Ausbeute bei 30 s Voraktivierung, 30.7% bei 7 min Voraktivierung) und der Aufbau einer ACP-Sequenz^[16] mit N-TBTU (60.2% bei 30 s Voraktivierung, 34.1% nach 7 min, siehe „Hintergrundinformationen“).

Wie sich die hier diskutierten Spezies **1** und **2** auf die Bildung von **3** und **4** auswirken, kann detailliert untersucht werden, da für einfache Aminosäurederivate wie Fmoc-Val-OH^[22] die O- und N-Acyllderivate **3a** und **4a** mittels HPLC separat bestimmt werden können. So lieferte die Umsetzung von Fmoc-Val-OH mit O-HBTU in DMF in Gegenwart von 1 Äquiv. DIEA innerhalb von 2 min 99.5% der O-Spezies **3** und 0.5% N-Acyllderivat **4**; nach 15 min beträgt das Verhältnis 88:12. Bei Verwendung von N-HBTU beträgt dagegen das O/N-Verhältnis nach 2 min bereits 87.9:12.1, was auf einen klaren Einfluss der Struktur des Kupplungsreagens auf die Struktur der anfänglich gebildeten aktivierten Spezies hinweist. Da der überwiegende Teil einer Acylierungsreaktion in den ersten Minuten der Reaktionszeit abläuft, kann mit den erzielten Ergebnissen – sofern ihre allgemeine Gültigkeit gezeigt werden kann – die höhere Effektivität der Uroniumsalze und einer kurzen Voraktivierungszeit erklärt werden.^[23, 24]

Ein besonders klarer Hinweis auf die erhöhte Reaktivität der O-Verbindungen konnte aus Studien zur Peptidcyclisierung abgeleitet werden (Tabelle 2). Bei Verwendung von N-HBTU haben nach 15 s 91 % des linearen Peptids noch nicht reagiert, während mit O-HBTU bereits mehr als 50 % umgesetzt waren. Die Cyclisierung mit N-HBTU liefert das monomere *all*-L-Cyclopeptid mit einer etwas höheren Ausbeute als bei Verwendung des O-Isomers, und gegenüber der Segmentkondensation verursacht die O-Form eine deutlich höhere Epimerisierung. Die Gründe für diese Unterschiede sind nicht klar, wenngleich ähnliche Effekte auch bei anderen Vergleichen von Cyclisierungsreaktionen und normalen Segmentkupplungen beobachtet worden sind,^[25] möglicherweise verursacht durch ein verändertes Ausmaß der beide Reaktionen begleitenden Oxazolombildung.

Tabelle 2. Cyclisierung von H-Ala-Ala-Ala-BnAla-Ala-Ala-OH unter Verwendung der O- und N-Isomere von HBTU und HATU (Ausbeuten in %).^[a]

	O-HBTU	N-HBTU	O-HATU	N-HATU
lineares <i>all</i> -L-Peptid ^[b]	11.6(48.4) ^[c]	9.0(91.2) ^[c]	7.5(27.7) ^[c]	0(45) ^[c]
<i>all</i> -L-Cyclomonomer	31.4(18.4)	37.6(3.0)	56.3(46.5)	68.4(32.0)
epimeres Cyclomonomer	7.5	4.2	4.1	< 4

[a] 10^{-3} M in DMF, 1.1 Äquiv. Kupplungsreagens, 2 Äquiv. TMP + 1 Äquiv. DIEA, HPLC-Analyse nach 60 min. [b] Enthält möglicherweise epimerisiertes lineares Peptid. [c] In Klammern: HPLC-Werte nach 15 s.

Verwendete Abkürzungen

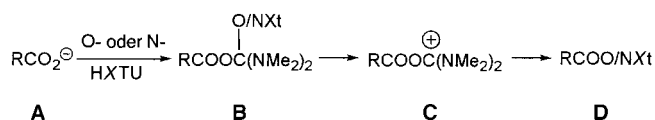
Aib: α -Aminoisobuttersäure, **ACP**: Acyl-Carrier-Protein-Decapeptid, **BOP**: Benzotriazol-1-yl-*N*-oxy-tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorophosphat, **DIEA**: *N,N*-Diisopropylethylamin, **HAPyU**: 1-(1-Pyrrolidinyl)-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinylmethyl-pyrrolidinium-hexafluorophosphat-3-oxid, **N-HATU**: 1-[Bis(dimethylamino)methylen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium-hexafluorophosphat-3-oxid, **O-HATU**: *N*-(1*H*-1,2,3-Triazolo[4,5-*b*]pyridin-1-yloxy)(dimethylamino)methylen-*N*-methylmethanaminium-hexafluorophosphat, **N-HBTU**: 1-[Bis(dimethylamino)methylen]-1*H*-benzotriazolium-hexafluorophosphat-3-oxid, **O-HBTU**: *N*-(1*H*-Benzotriazol-1-yloxy)(dimethylamino)methylen-*N*-methylmethanaminium-hexafluorophosphat, **HOAt**: 7-Aza-1-hydroxybenzotriazol, **HOBT**: 1-Hydroxybenzotriazol, **PyBOP**: Benzotriazol-1-yl-*N*-oxytris(pyrrolidino)phosphonium-hexafluorophosphat, **TBTU**: Tetrafluoroborat-Analogon von HBTU, **TMP**: 2,4,6-Trimethylpyridin (Collidin), **Z**: Benzylloxycarbonyl.

Eingegangen am 25. Mai 2001 [Z17171]

- [1] B. Castro, J. R. Dormoy, B. Dourtoglou, G. Evin, C. Selve, J. C. Ziegler, *Synthesis* **1976**, 751.
- [2] J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 205.
- [3] a) V. Dourtoglou, J. C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 1269; b) V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Ziodrou, *Synthesis* **1984**, 572.
- [4] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4397.
- [5] a) H. O. Kalinowski, H. Kessler, *Chem. Ber.* **1979**, 112, 1153; b) H. O. Kalinowski, H. Kessler, *Org. Magn. Reson.* **1975**, 7, 128.
- [6] I. Abdelmoty, F. Albericio, L. A. Carpino, B. M. Foxman, S. Kates, *Lett. Pept. Sci.* **1994**, 1, 57.
- [7] P. Henklein, B. Costisella, V. Wray, T. Domke, L. A. Carpino, A. El-Faham, S. A. Kates, I. Abdelmoty, B. M. Foxman, *Peptides 1996. Abstracts of the 24th Eur. Pept. Symp.*, Mayflower Scientific, Kingswinford, UK, **1998**, S. 465.
- [8] „Innovations and Perspectives in Solid Phase Synthesis“: P. Henklein, C. Mügge, B. Costisella, V. Wray, T. Domke, A. El-Faham, Y. Lee,

- S. A. Kates, L. A. Carpino, *Collected Papers of the 5th Int. Symp.*, Mayflower Scientific, Birmingham, **1999**, S. 309.
- [9] T. Wada, Y. Sato, F. Honda, S.-I. Kawahara, M. Sekine, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 12710. Siehe auch: P. Gund, *J. Chem. Educ.* **1972**, 49, 100.
- [10] Die Verwendung von KOBt^[11] zur Synthese von HBTU wurde erstmals von Knorr et al.^[12] beschrieben, wobei keine experimentellen Details gegeben wurden. Folgt man exakt einer von Knorr als persönliche Mitteilung übermittelten Vorschrift (siehe Houben-Weyl, Vol. E22a, Kap. 3.8, im Druck), so erhält man ausschließlich N-HBTU. Es kann deshalb angenommen werden, dass alle kommerziell verfügbaren HBTU-Chargen Guanidiniumisomere sind und nicht Uroniumisomere. Das O-Isomer ist entsprechend der in den „Hintergrundinformationen“ beschriebenen Synthesevorschrift herstellbar; neben der Verwendung der Kaliumsalze ist vor allem die sehr kurze Reaktions- und Aufarbeitungszeit zu beachten.
- [11] K. M. Sivanandaiah, V. V. S. Babu, S. C. Shankaramma, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, 44, 24.
- [12] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillesen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1927.
- [13] H. N. Gopi, V. V. S. Babu, *Indian J. Chem. Sect. B* **1998**, 37, 394.
- [14] Röntgenstrukturanalyse: Enraf-Nonius CAD-4 Diffraktometer, $\theta/2\theta$ -Scans, graphitmonochromatisierte $\text{Cu}_{K\alpha}$ -Strahlung ($\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$). Die Strukturen wurden durch Direkte Methoden gelöst (SIR92: A. Altomare, G. Casciaro, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, M. C. Burla, G. Polidori, M. Camalli, *J. Appl. Crystallogr.* **1994**, 27, 435). Strukturverfeinerung durch Volle-Matrix-kleinste-Fehlerquadrat-Methoden gegen $|F|$ und unter Verwendung anisotroper Verschiebungsparameter für P, O, F, C und N-Atome bei fixierten H-Atomen (CRYSTALS 2000: D. J. Watkin, C. K. Prout, J. R. Carruthers, P. W. Betteridge, R. I. Cooper, Chemical Crystallography Laboratory, University of Oxford, Oxford, UK). Kristallstrukturdaten für **1b** ($\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{OF}_6\text{N}_6\text{P}$) bei 294 K: monoklin, Raumgruppe $P2_1/n$, $a = 6.3787(6)$, $b = 19.696(5)$, $c = 13.330(3) \text{ \AA}$, $\beta = 99.94(1)^\circ$; $V = 1649.6(6) \text{ \AA}^3$, $Z = 4$, $\rho_{\text{ber.}} = 1.531 \text{ g cm}^{-3}$, Kristalldimensionen $0.18 \times 0.18 \times 0.72 \text{ mm}$; $R = 0.0630$, $R_w = 0.0912$, basierend auf 1923 beobachteten Reflexen ($I > 1.96\sigma(I)$; total 3044, $2\theta_{\text{max}} = 67^\circ$) und 218 verfeinerten Parameter sowie isotroper Extinktionskorrektur. Es wurden Zerfalls- und Absorptionskorrekturen (Transmissionsfaktoren 0.64–0.67) angewendet; max. Restelektronendichte 0.46 e \AA^{-3} . Kristallstrukturdaten für **1a** ($\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{OF}_6\text{N}_5\text{P}$) bei 294 K: Monoklin, Raumgruppe $P2_1/c$, $a = 8.3999(13)$, $b = 28.799(4)$, $c = 7.0528(5) \text{ \AA}$, $\beta = 109.857(9)^\circ$; $V = 1604.7(4) \text{ \AA}^3$, $Z = 4$, $\rho_{\text{ber.}} = 1.570 \text{ g cm}^{-3}$, Kristalldimensionen $0.29 \times 0.58 \times 0.58 \text{ mm}$; $R = 0.0614$, $R_w = 0.0786$, 2530 beobachtete Reflexe ($I > 1.96\sigma(I)$; total 3440, $2\theta_{\text{max}} = 78^\circ$) und 272 verfeinerte Parameter unter Einbeziehung der Beschreibung einer 50:50-Fehlordnung des PF_6^- -Ions sowie isotroper Extinktionskorrektur; max. Restelektronendichte 0.32 e \AA^{-3} . CCDC 163597 (**1b**) und 163598 (**1a**) enthält die ausführlichen kristallographischen Daten zu dieser Veröffentlichung. Die Daten sind kostenlos über www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html erhältlich (oder können bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: Cambridge Crystallographic Data Centre, 12, Union Road, Cambridge CB2 1EZ; Fax: (+44) 1223-336-033; oder deposit@ccdc.cam.ac.uk).
- [15] a) R. Baumgarten, *J. Chem. Educ.* **1996**, 43, 399; b) J. B. Hendrickson, R. Bergeron, A. Giga, D. Sternbach, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 3412; c) P. J. DeChristopher, J. P. Adamek, G. D. Lyon, S. A. Klein, R. J. Baumgarten, *J. Org. Chem.* **1974**, 39, 3525.
- [16] L. A. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 201.
- [17] L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 3561.
- [18] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, 103, 788.
- [19] a) M. Crisma, F. Moretto, F. Formaggio, C. Toniolo, *Z. Kristallogr.* **1999**, 214, 766; b) M. Vlasi, G. Germain, K. Barlos, P. Mamos, L. S. Refaat, *Z. Kristallogr.* **1990**, 192, 59.
- [20] Zur Demonstration der höheren Reaktivität der O-Acyl-Spezies siehe: K. Barlos, D. Papaionnou, D. Theodoropoulos, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1984**, 23, 300.
- [21] T. Redemann, G. Jung, *Peptides 1996. Abstracts of the 24th Eur. Pept. Symp.*, Mayflower Scientific, Kingswinford, UK, **1998**, S. 749.
- [22] M. J. Fazio, J. Somerville (Dow Chemical Co.), persönliche Mitteilung an P. Henklein, **1995**.

- [23] Zur auffälligen zeitabhängigen Zersetzung von N-HATU- bzw. von den bei N-HATU-Aktivierung gebildeten Zwischenprodukten siehe: H. Gausepohl, C. Behn, *Peptides 1996. Abstracts of the 24th Eur. Pept. Symp.*, Mayflower Scientific, Kingswinford, UK, **1998**, S. 409.
- [24] Die Natur der in einem besonderen Fall gebildeten Zwischenprodukte hängt vom Substrat, vom Lösungsmittel, vom Charakter und der Menge der Base und von der Gegenwart oder Abwesenheit von HOXt ab. So wird beispielsweise Z-Gly-Ala-OH in CH₂Cl₂ von N-TBTU in Gegenwart von 2 Äquiv. DIEA in weniger als 2 min in das Oxazolon umgewandelt, und der OBt-Ester bildet sich nur sehr langsam (>1 h). In Gegenwart von je 1 Äquiv. DIEA und HOBt erfolgt dagegen vollständige OBt-Esterbildung innerhalb von 30 s, und auch danach ändert sich das Oxazolon/OBt-Ester-Verhältnis kaum. Im Falle der Aktivierung von Fmoc-Aib-OH mit N-HATU ist sowohl die Bildung von Oxazolon (1690, 1829 cm⁻¹) als auch von O- (1819 cm⁻¹) und N-Acyl-Spezies (1722 cm⁻¹) nachweisbar. Nach 5–6 min ist das Oxazolon umgesetzt, und das O-Acylderivat hat sich in das N-Acyl-Isomer umgewandelt, sodass die 3N-Form zur vorherrschenden Spezies wird. Der Verlust der stereochemischen Integrität bei Segmentkupplungen in Gegenwart einer Base wird mit dem Ausmaß der Oxazolonbildung in Beziehung gebracht. Es könnten aber auch andere Zwischenprodukte der Bildung der OXt-Ester vorgelagert sein. Ein mögliches Zwischenprodukt könnte das über das tetraedrische Intermediat **B** gebildete O-Acyluronium-Kation **C**



sein. Von mehreren sterisch gehinderten Säuren (Mesitylsäure, Pivalinsäure) konnten O-Acyluroniumsalze isoliert und identifiziert werden. Im Falle der Mesitylsäure-Derivate erwies sich diese Spezies als reaktiver als der entsprechende OAt-Ester. Kenntnisse zur möglichen Bildung von **C** und seiner Umwandlung in Aktivester oder seiner direkten Teilnahme am Reaktionsprozess könnten hilfreich sein, die Unterschiede in der Reaktivität von N-HATU und N-HAPyU oder zwischen N-HATU und N-HBTU zu erklären. Die Lebensdauer von Zwischenprodukten wie **C** in Gegenwart von Nucleophilen wie OXt⁽⁻⁾ ist äußerst gering und eine direkte Einbeziehung in den Aktivierungsprozess bisher nicht nachgewiesen. Eine Reaktion unter Beteiligung von **C** wäre am wahrscheinlichsten, wenn keine oder eine sehr kurze Voraktivierung erfolgt, also unter Bedingungen, die sich im Allgemeinen vorteilhaft auf den schrittweisen Aufbau von Peptiden und auf die Erhaltung der stereochemischen Integrität bei Segmentkupplungen auswirken.

- [25] J. Klose, M. Bienert, C. Mollenkopf, D. Wehle, C. Zhang, L. A. Carpino, P. Henklein, *Chem. Commun.* **1999**, 1847.

Kapillarelektrophoretische Analyse von DNA-Addukten als Biomarker der Kanzerogenese**

Oliver Johannes Schmitz,*

Christian Christoph Theophil Wörth, Dirk Stach und Manfred Wießler

Kovalente Modifikationen der DNA, DNA-Addukte, die durch reaktive Substanzen exogenen oder endogenen Ursprungs gebildet werden, zählen zu den frühesten Ereignissen in der Krebsentstehung. Die Bildung dieser DNA-Addukte stellt einen kritischen und detektierbaren Schritt in der Kanzerogenese dar. Aus diesem Grund können DNA-Addukte als frühe Biomarker genutzt werden.

Um die pathologische Signifikanz der DNA-Addukte bei Krankheiten wie Krebs zu ermitteln, ist es notwendig, Analysemethoden zu entwickeln, die einen hohen Probandendurchsatz sowie eine simultane Detektion verschiedener DNA-Adduktklassen gewährleisten. In der EPIC-Studie (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) wurden z. B. 470 000 Personen aus neun europäischen Ländern über ihre Ernährung und Lebensgewohnheiten befragt.^[1] Für zukünftige Analysen von Biomarkern, z. B. DNA-Addukten,^[2] wurden auch Blutproben entnommen. Die sehr empfindliche ³²P-Postlabelling-Methode^[3] wird bei solchen Studien wegen ihrer verschiedenen Nachteile wie der fehlenden Automatisierungsmöglichkeit, dem notwendigen starken β -Strahler ³²P und der Tatsache, dass unterschiedliche DNA-Adduktklassen nicht simultan detektiert werden können, vermieden. Zur Bestimmung von DNA-Addukten mit LC-MS werden ungefähr 300 μ g DNA benötigt.^[4] Obwohl diese Methode sehr hilfreich für die Charakterisierung unbekannter DNA-Addukte ist, kann sie in der Routineanalytik nicht eingesetzt werden. Die benötigten großen DNA-Mengen stehen meistens nicht zur Verfügung und verteuern darüber hinaus die DNA-Hydrolyse erheblich. Außerdem können nur ähnliche DNA-Addukte in einem Analysenlauf getrennt werden. Aus diesen Gründen wird eine neue analytische Methode mit einem hohen Probandendurchsatz benötigt, die bei nur 10 μ g DNA eine simultane Bestimmung unterschiedlicher Adduktklassen ermöglicht. Seit 1988 versuchen die Arbeitsgruppen von Sharma und Giese, die Fluoreszenzderivatisierung von Nucleotiden zu optimieren.^[5] Allerdings führte bisher weder die beschriebene Konjugation

[*] Dr. O. J. Schmitz,^[+] Dr. C. C. T. Wörth, D. Stach, Prof. Dr. M. Wießler
Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
Abteilung Molekulare Toxikologie (Deutschland)
E-mail: olivers@uni-wuppertal.de

[+] Aktuelle Adresse des Korrespondenzautors:
Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal
FB 9/Analytische Chemie
Gaußstr. 20, 42119 Wuppertal (Deutschland)
Fax: (+49) 202-4393915

[**] Wir bedanken uns bei H. Schmeiser, E. Frei und W. V. Turner für viele hilfreiche Diskussionen, bei E. Eder für Hex-dGMP, bei W. E. Hull für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen und bei der Deutschen Bundesstiftung Umwelt für die finanzielle Unterstützung.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.