

N-Hydroxyverbindungen als Katalysatoren für die Aminolyse aktivierter Ester

Wolfgang König und Rolf Geiger*

Farbwerke Hoechst AG, Pharma Synthese, D-6230 Frankfurt a. M. 80, Postfach 8003 20

Eingegangen am 16. August 1973

Die Aminolyse negativ substituierter Phenylester, wie 4-Nitrophenyl- oder 2,4,5-Trichlorphenylester wird durch *N*-Hydroxyverbindungen, die etwa die Acidität der Essigsäure besitzen, in polaren Lösungsmitteln wie Dimethylformamid stark beschleunigt. In verschiedenen Tests haben sich besonders 1-Hydroxybenzotriazol, 1-Hydroxy-2-pyridon und 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydrochinazolin als Katalysatoren bewährt. Mit Hilfe dieses Verfahrens wurden die Peptide **5** und **8** dargestellt.

N-Hydroxy Compounds as Catalysts for the Aminolysis of Activated Esters

The aminolysis of negatively substituted phenyl esters such as 4-nitrophenyl or 2,4,5-trichlorophenyl esters is accelerated in polar solvents, e. g. dimethylformamide, by *N*-hydroxy compounds with the approximate acidity of acetic acid. According to different tests the following compounds are particularly suitable catalysts: 1-hydroxybenzotriazole, 1-hydroxy-2-pyridone, and 3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydrochinazoline. This aminolysis was utilized in the synthesis of the peptides **5** and **8**.

Anlässlich des 3. Amerikanischen Peptidsymposiums in Boston berichteten wir über die Aminolyse von aktivierten Estern¹⁾. Sie wird von *N*-Hydroxyverbindungen, deren pK_a -Wert etwa dem der Essigsäure entspricht, stark beschleunigt. Dieser Effekt ist besonders an 4-Nitrophenyl- und 2,4,5-Trichlorphenylestern zu beobachten. Die Reaktionsgeschwindigkeit schwächer oder stärker aktiverter Ester war durch die neuen Katalysatoren nicht oder nur mäßig zu beeinflussen. Eine besondere Rolle spielt das Lösungsmittel. Nur in stark polaren Lösungsmitteln wie Dimethylformamid oder Dimethylacetamid wirken solche *N*-Hydroxyverbindungen katalysierend. Dagegen wird in Tetrahydrofuran die Aminolyse von 2,4,5-Trichlorphenylestern gehemmt. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu Beobachtungen mit den bis jetzt bekannten Katalysatoren vom Imidazol- und Triazoltyp^{2–5)}, die ihre katalytische Wirkung besonders in unpolaren Lösungsmitteln entfalten, während sie in Dimethylformamid kaum eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit bewirken⁶⁾.

- 1) W. König und R. Geiger in *J. Meienhofer, Chemistry and Biology of Peptides*, S. 343 bis 349, Ann Arbor Science Publishers, Inc., Michigan 1972.
- 2) Th. Wieland, H. Determann und W. Kahle, Angew. Chem. **75**, 209 (1963).
- 3) R. H. Mazur, J. Org. Chem. **28**, 2498 (1963).
- 4) H. C. Beyerman und W. Maassen van den Brink, Proc. Chem. Soc. **1963**, 266.
- 5) H. C. Beyerman, W. Maassen van den Brink, F. Weygand, A. Prox, W. König, L. Schmidhammer und E. Nintz, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas **84**, 213 (1965).
- 6) Th. Wieland und W. Kahle, Liebigs Ann. Chem. **691**, 212 (1966).

In verschiedenen Testsystmenen haben sich vor allem Verbindungen vom 1-Hydroxybenzotriazol- und 1-Hydroxy-2-pyridon-Typ bewährt. Auch 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydrochinazolin lieferte gute Ergebnisse. *N*-Hydroxysuccinimid, dessen pK_a -Wert ebenfalls im interessanten Bereich liegt, wirkte nur in einem einzigen Test, bei der Synthese von Z-Val-cyclohexylamid, stark katalysierend. Bei Peptidsynthesen traten jedoch in Abhängigkeit vom Modell eher hemmende als katalysierende Eigenschaften des *N*-Hydroxysuccinimids zutage.

In Anlehnung an *Merz* und *Determann*⁷⁾ untersuchten wir die Katalyse vor allem in folgenden drei Testsystmenen: Z-Phenylalanin-Aktivester wurden in Dimethylformamid mit Valin-*o*-nitroanilid, Valylglycin-*o*-nitroanilid oder Prolylglycin-*o*-nitroanilid umgesetzt. Die Reaktion wurde bei 25°C fünf Stunden lang verfolgt und die Umsetzung jeweils durch Zugabe von 1 n NaOH gestoppt und das Reaktionsprodukt isoliert. Die UV-Extinktion des *o*-Nitroanilids bei 350 nm war ein Maß für die Ausbeute.

Wie man der Tab. 2 entnehmen kann, hängt die Aminolyse und die Katalysierbarkeit der Aminolyse sehr von der Aminokomponente ab. Z. B. lässt sich die Umsetzung mit dem sterisch stark gehinderten H-Val-Gly-*o*-nitroanilid mit 1-Hydroxybenzotriazol besser katalysieren als die mit dem sterisch wenig gehinderten, aber basischen H-Pro-Gly-*o*-nitroanilid. Das stark saure 1-Hydroxy-6-nitrobenzotriazol katalysiert dagegen die Umsetzung mit der Prolinverbindung besser.

Tab. 1. Halbwertszeiten bei der Synthese von Z-Phe-Val-*o*-nitroanilid aus Z-Phe-Estern und H-Val-*o*-nitroanilid (Konzentration: je 5 μ mol/ml, Temperatur: 25°C, Bestimmung der Ausbeute im UV bei 350 nm)

Z-Phe-Aktivester	Lösungsmittel	Katalysator	Halbwertszeit (min)	Reaktionszeit bei 25% Ausb. (min)
OBt ⁸⁾	DMF	—	<0.5	
OBt	THF	—	<1.0	<0.5
ONSu ⁹⁾	DMF	—	130	30
ONSu	THF		>300	65
ONSu	DMF	HOBr	21	5
ONSu	THF	11OBt	>300	90
OTep ¹⁰⁾	DMF	—	>300	140
OTep	THF	—	>300	>300
OTep	DMF	HOBr	0.5	
OTep	THF	HOBr	völlige Hemmung	
OTep	DMF	HONSu	>300	250

⁷⁾ *D. Merz* und *H. Determann*, Liebigs Ann. Chem. **728**, 215 (1969).

⁸⁾ *W. König* und *R. Geiger*, Chem. Ber. **103**, 788 (1970).

⁹⁾ *G. W. Anderson*, *J. E. Zimmerman* und *F. C. Callahan*, J. Amer. Chem. Soc. **86**, 1839 (1964).

¹⁰⁾ *J. Pless* und *R. A. Boissonnas*, Helv. Chim. Acta **46**, 1609 (1963).

Tab. 2. Halbwertszeiten bei der Synthese von Z-Phe-Val-Gly-*o*-nitroanilid und Z-Phe-Pro-Gly-*o*-nitroanilid aus Z-Phe-OTcp und den entsprechenden Dipeptid-*o*-nitroaniliden (Lösungsmittel: Dimethylformamid, Konzentration: je 5 μ mol/ml, Temperatur: 25°C, Bestimmung der Ausbeute im UV bei 350 nm)

Zusatz	Halbwertszeit (min) der Bildung von Z-Phe-Val-Gly- <i>o</i> -nitroanilid	Z-Phe-Pro-Gly- <i>o</i> -nitroanilid
kein Zusatz	162.0	82.0
1-Hydroxybenzotriazol ¹¹⁾	0.5	1.25
5,6-Dichlor-1-hydroxybenzotriazol ¹²⁾	2.0	2.0
1-Hydroxy-6-nitrobenzotriazol ¹³⁾	9.0	5.0
1-Hydroxy-2-pyridon ¹⁴⁾	0.5	1.0
1-Hydroxy-4-methyl-2-pyridon ¹⁴⁾	0.5	1.5
1-Hydroxy-4,6-dimethyl-2-pyridon ¹⁵⁾	5.0	57.0
3,5-Dichlor-1-hydroxy-4,6-dimethyl-2-pyridon ¹⁶⁾	2.5	21.0
3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydrochinazolin ¹⁷⁾	2.0	21.0
<i>N</i> -Hydroxysuccinimid ¹⁸⁾	63.0	195.0
3-Hydroxy-4-methyl-2,3-dihydrothiazol-2-thion ¹⁶⁾	6.0	31.0

Besonders auffällig verhält sich *N*-Hydroxysuccinimid. Während es die Aminolyse durch H-Val-Gly-*o*-nitroanilid noch katalysiert, hemmt es die Reaktion mit der entsprechenden Prolinverbindung. Die Aminolyse durch die schwach basischen Aniline kann mit den *N*-Hydroxyverbindungen nicht beschleunigt werden.

Es fällt auf, daß die Halbwertszeiten der 1-Benzotriazolylester und der mit 1-Hydroxybenzotriazol katalysierten 2,4,5-Trichlorphenylester praktisch identisch sind (Tab. 1). So stellt sich die Frage, ob bei der Katalyse intermediär 1-Benzotriazolylester entstehen. Das ist der Fall. Die IR-spektroskopische Untersuchung einer Lösung von Essigsäure-4-nitrophenylester und HOBr in Dimethylsulfoxid ergab eindeutig eine kleine Bande bei 1820 cm^{-1} , die für den HOBr-Ester charakteristisch ist⁸⁾. Gibt man der Lösung *N*-Äthylmorpholin zu, so erscheint sofort eine starke Absorptionsbande an dieser Stelle. In Tetrahydrofuran erscheint die charakteristische HOBr-Esterbande wesentlich langsamer und wird erst im Laufe von 1–2 Stunden sichtbar.

Diese Versuche zeigen, daß sich zwischen dem 4-Nitrophenylester und dem 1-Benzotriazolylester ein Gleichgewicht ausbildet, das bei saurem pH auf der Seite des 4-Nitrophenylesters liegt und sich bei Basenzusatz zugunsten des HOBr-Esters verschiebt.

¹¹⁾ R. Nietzki und E. Braunschweig, Ber. Deut. Chem. Ges. **27**, 3381 (1894).

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

¹³⁾ Th. Curtius und M. Mayer, J. Prakt. Chem. [2] **76**, 374 (1907).

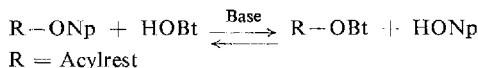
¹⁴⁾ E. R. Squibb & Sons (Erf. E. N. Shaw), US-Pat. 2540218 (6. 2. 1951) [C. A. **45**, 6224 a (1951)].

¹⁵⁾ Farbwerke Hoechst AG (Erf. G. Lohaus und W. Dittmar) D.O.S. 1795270 (30. 12. 1971).

¹⁶⁾ Farbwerke Hoechst AG (Erf. W. König, R. Geiger und H. Wissmann) D.O.S. 2 202 613 (30. 8. 1973).

¹⁷⁾ D. Harrison und A. C. B. Smith, J. Chem. Soc. **1960**, 2157.

¹⁸⁾ Farbenfabriken Bayer AG (Erf. R. Wegler, F. Grewe und K. Mehlhose), US-Pat. 2816111 (10. Dez. 1957) [C. A. **52**, 6406 (1958)].



Die frühere Vermutung¹⁾, daß die Katalyse direkt über Komplexe abläuft, konnte nicht bestätigt werden, doch kann die Beteiligung eines Komplexes an der raschen Einstellung des Gleichgewichts nicht ausgeschlossen werden. Weiterhin unklar bleibt die Hemmung der Aminolyse in Tetrahydrofuran durch die N-Hydroxyverbindungen, zumal im IR auch in Tetrahydrofuran die HOBt-Esterbande gefunden wurde.

Unter Anwendung der neuen Acylierungskatalysatoren wurde das Tetrapeptid Z-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂ (carboxylendständige Sequenz von Secretin) und das Tripeptid Z-Pro-Ile-Gly-NH₂ (carboxylendständige Sequenz von Mesotocin) stufenweise aufgebaut.

Gln	Gly	Leu	Val	Reaktionszeit u. Ausb.
		Z-OPcp	H-NH ₂	
		HOBt		10 min
		Z	NH ₂	1 (98%)
		H ₂ /Pd		
		Z-OTcp	H-NH ₂	2 (100%)
		HOBt		5 min
		Z	NH ₂	3 (90%)
		H ₂ /Pd		
		Z-ONp	H-NH ₂	4 (88%)
		HOBt		10 min
		Z	NH ₂	5 (91%)

Pro	Ile	Gly		
	Z-OTcp	H-NH ₂		
	Kat ¹⁹⁾		nur Lösungszeit	
	Z	NH ₂	6 (89%)	
	H ₂ /Pd			
	Z-ONp	H-NH ₂	7	
	Kat ¹⁹⁾			
	Z	NH ₂	8	15 min } (80%)

Wie aus den Reaktionsschemata zu erkennen ist, genügt es, die Komponenten in Dimethylformamid zu lösen, das Lösungsmittel abzudestillieren und aufzuarbeiten.

Da man nach der „backing-off“-Methode, die durch Goodman²⁰⁾ eingeführt wurde, auch von Dipeptiden und höheren Peptiden racemisierungsfrei Aktivester herstellen kann, stellt sich die Frage, ob die neuen Katalysatoren die Racemisierung beeinflussen.

¹⁹⁾ Kat = 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydrochinazolin.

²⁰⁾ M. Goodman und K. C. Stueben, J. Amer. Chem. Soc., **81**, 3980 (1959).

Mit dem gaschromatographischen Racemisierungstest nach *Weygand*^{21, 22)} konnte nachgewiesen werden, daß die sauren *N*-Hydroxyverbindungen bei der Katalyse der Aminolyse von Aktivestern nicht racemisierend wirken. Bei den Pentachlorphenylestern, die per se stark racemisieren, konnte die Racemisierung durch Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazol sogar gesenkt werden.

Tab. 3. Racemisierungsuntersuchungen bei der Synthese von Boc-Leu-Phe-Val-OBu^t aus Boc-Leu-Phe-Aktivestern und H-Val-OBu^t unter dem Einfluß von Acylierungskatalysatoren (Lösungsmittel: Dimethylformamid, Temperatur: 20°C, Konzentration: je 0.2 mmol/ml)

Boc-Leu-Phe	Katalysator	Reaktionszeit	D-Phe-L-Val
-ONp	—	70 h	<2%
-ONp	HOBu ^t	5 min	<2%
-OPcp	—	70 h	40%
-OPcp	HOBu ^t	5 min	27%
-OTcp	—	70 h	<2%
-OTcp	HOBu ^t	10 min	<2%
-OTcp	3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydrochinazolin	10 min	<2%
-OTcp	1-Hydroxy-2-pyridon	10 min	<2%

Als Katalysatoren haben sich besonders das leicht zugängliche 1-Hydroxybenzotriazol, das sich auch schon als racemisierungssenkender und ausbeuteerhöhender Zusatz bei der DCCI-Methode bewährt hat⁸⁾, 1-Hydroxy-2-pyridon und 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydrochinazolin bewährt. Auch Salze dieser sauren *N*-Hydroxyverbindungen wirken katalysierend. Sie können gleichzeitig zur Freisetzung der Base aus den Esterhydrochloriden dienen. Das Natriumsalz des 1-Hydroxybenzotriazols wurde bei der Synthese von Z-Phe-Val-OMe mit gutem Erfolg eingesetzt.

Bei der Verwendung von Aminosäure-Nps-Aktivester ist 1-Hydroxybenzotriazol nicht zu empfehlen, da es dazu neigt, die Nps-Gruppen abzuspalten²³⁾.

Auch bei der Festkörpermethode lassen sich diese Katalysatoren mit gutem Erfolg einsetzen. Darüber wurde bereits anlässlich des 12. Europäischen Peptidsymposiums in Reinholdsbrunn berichtet²⁴⁾.

Unseren Mitarbeitern *E. Löw*, *P. Pogoda*, *P. Pokorný* und *P. Nickel* danken wir für ihre wertvolle Mitarbeit bei der experimentellen Bearbeitung des Themas.

Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren bestimmt und sind nicht korrigiert. Die Drehwerte wurden in einem 1-dm-Rohr im lichtelektrischen Polarimeter Mod. 141 der Fa. Perkin-Elmer gemessen, die chromatographische Reinheit auf Dünnschichtplatten (Kieselgel F-254) der Fa. Merck in verschiedenen Laufmitteln geprüft.

21) *W. König* und *R. Geiger*, *Chem. Ber.* **103**, 2024 (1970).

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

23) *J. Rudinger*, persönliche Mitteilung.

24) *H. Wissmann*, *W. König* und *R. Geiger*, in *H. Hanson* und *H.-D. Jakubke*, *Peptides 1972*, S. 158–161, North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1973.

Abkürzungen:

Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl	OBu ^t	<i>tert</i> -Butylester
DCCI	Dicyclohexylcarbodiimid	ONSu	N-Hydroxysuccinimidester
HOEt	1-Hydroxybenzotriazol	ONp	<i>p</i> -Nitrophenylester
HONSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid	OTcp	2,4,5-Trichlorphenylester
Nps	<i>o</i> -Nitrophenylsulfenyl	OPcp	Pentachlorphenylester
OBt	1-Benzotriazolylester	Z	Benzoyloxycarbonyl

1. *Kinetische Untersuchungen bei der Synthese von Benzoyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-valin-o-nitroanilid aus Benzoyloxycarbonyl-L-phenylalanin-Aktivestern und L-Valin-o-nitroanilid* (s. Tab. 1): 23.7 mg (0.1 mmol) H-Val-o-nitroanilid und 0.1 mmol eines Z-Phe-Aktivesters werden in je 10 ml DMF oder THF gelöst. Beide Lösungen werden bei 25°C vereinigt. Die Katalysatoren werden jeweils in 0.1 mmol-Mengen dem Aktivester zugesetzt. Nach 0.5, einer, 2, 5, 10, 30, 60, 180 und 300 min wird eine 2-ml-Probe entnommen. Diese Proben gibt man in Scheidetrichter, in die 0.5 ml 1 N NaOH vorgelegt sind. Wird die Reaktion in THF durchgeführt, so gibt man zur vorgelegten Natronlauge noch 1 ml DMF. Man lässt ca. 1 min stehen, gibt dann 25 ml Essigester und 25 ml 2 N HCl zu und schüttelt gut durch. Die Essigesterphase wird dann hintereinander mit 25 ml 2 N HCl, 2 mal mit je 25 ml gesätt. NaHCO₃-Lösung und 2 mal mit je 2 N HCl ausgeschüttelt, über Na₂SO₄ getrocknet und in einem Meßkolben auf 50 ml aufgefüllt. Der Meßkolben enthält dann das durch Aminolyse des Esters entstandene Peptid bereits in geeigneter Verdünnung für die Messung bei 350 nm. Als Nullwert dient eine Probe, die nur die entsprechende Menge Amin enthält, aber analog ausgeschüttelt und verdünnt wird.

2. *Kinetische Untersuchungen bei der Synthese von Benzoyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-valyl-glycin-o-nitroanilid und Benzoyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-proyl-glycin-o-nitroanilid aus Benzoyloxycarbonyl-L-phenylalanin-2,4,5-trichlorphenylester und den entsprechenden Dipeptid-o-nitroaniliden* (s. Tab. 2): 48 mg (0.1 mmol) Z-Phe-OTcp und 0.1 mmol des entsprechenden Dipeptid-o-nitroanilids werden in je 10 ml DMF gelöst. Die Katalysatoren werden jeweils in 0.1 mmol-Mengen dem Z-Phe-OTcp zugesetzt. Man verfährt weiter wie bei Beispiel 1.

3. *Ausgangs- und Vergleichssubstanzen für die kinetischen Untersuchungen:* Die *o*-Nitroanilide wurden nach der Phosphoroxychlorid-Methode²⁵⁾ hergestellt.

a) *Benzoyloxycarbonyl-L-valin-o-nitroanilid*: Zu einer Lösung von 10.05 g (0.04 mol) Z-Val-OH und 5.52 g (0.04 mol) *o*-Nitroanilin in 150 ml absol. THF gibt man bei -15°C 3.72 ml Phosphoroxychlorid und unter Rühren tropfenweise 6.4 ml Pyridin. Nach beendeter Zugabe lässt man auf Raumtemp. kommen, lässt 2 h bei Raumtemp. stehen, gibt etwas Wasser zu und engt ein. Der Rückstand wird in Essigester gelöst und nacheinander mit NaHCO₃-Lösung, 2 N HCl und Wasser ausgeschüttelt, mit Na₂SO₄ getrocknet und eingeengt. Ausb. 6.3 g (43%), Schmp. 176°C, $[\alpha]_D^{20} = -73.8^\circ$ (c = 1, Dimethylacetamid).

C₁₉H₂₁N₃O₅ (371.4) Ber. C 61.45 H 5.70 N 11.32 Gef. C 61.9 H 5.8 N 11.3

b) *L-Valin-o-nitroanilid*: Zu einer Lösung von 5.2 g (14 mmol) Z-Val-*o*-nitroanilid in 40 ml Essigsäure gibt man bei Raumtemp. 15 ml 40 proz. HBr/Eisessig und lässt 1 h bei Raumtemp. stehen. Anschließend wird mit Äther gefällt. Ausb. 4.25 g, Schmp. 227°C. Das Hydrobromid wird zwischen Essigester und 2 N Na₂CO₃ verteilt. Die währ. Lösung wird noch zweimal mit Essigester extrahiert. Die Essigesterphasen werden vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet, eingeengt und der Rückstand mit Petroläther verrieben. Ausb. 2.7 g hellgelbe Kristalle (81%), $[\alpha]_D^{20} = -75.6^\circ$ (c = 1, Dimethylacetamid), Schmp. 74°C.

C₁₁H₁₅N₃O₃ (237.3) Ber. C 55.69 H 6.37 N 17.72 Gef. C 56.2 H 6.7 N 17.1

²⁵⁾ Th. Wieland und B. Heinke, Liebigs Ann. Chem. **615**, 184 (1958); **655**, 189 (1962).

c) *Benzylloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-valin-o-nitroanilid*: Zu einer Lösung von 1.5 g (5 mmol) Z-Phe-OH, 1.18 g (5 mmol) H-Val-o-nitroanilid und 675 mg (5 mmol) HOBT in 15 ml THF gibt man bei 0°C 1.1 g DCCI, gelöst in 10 ml THF und röhrt 1 h bei 0°C sowie 1 h bei Raumtemp. Da das Reaktionsprodukt neben dem Dicyclohexylharnstoff ausfällt, gibt man 10 ml DMF zu, wobei sich ein Teil löst. Anschließend wird eingeengt und der Rückstand mit NaHCO₃-Lösung verrieben, abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Um den Dicyclohexylharnstoff abzutrennen, wird das Reaktionsprodukt mit 150 ml DMF verrührt. Nach 15 min wird abgesaugt und das Filtrat eingeengt. Der Rückstand aus dem Filtrat wird aus Isopropylalkohol umkristallisiert. Ausb. 2.2 g (85 %), Schmp. 211°C, $[\alpha]_D^{20} = -66.8^\circ$ (c = 1, Dimethylacetamid).

$C_{28}H_{30}N_4O_6$ (518.6) Ber. C 64.84 H 5.83 N 10.81 Gef. C 65.1 H 6.0 N 10.7

d) *Benzylloxycarbonyl-L-valyl-glycin-o-nitroanilid*: Zu einer Lösung von 7.55 g (30 mmol) Z-Val-OH, 5.85 g (30 mmol) H-Gly-o-nitroanilid⁷⁾ und 4.05 g (30 mmol) HOBT in 50 ml absol. THF gibt man bei 0°C 6.6 g DCCI in 40 ml THF. Man lässt 1 h bei 0°C und 2 h bei Raumtemp. röhren. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit DMF so lange gewaschen, bis er weiß ist. Das Filtrat wird eingeengt. Der Rückstand wird mit NaHCO₃-Lösung und Wasser verrieben, abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Trocknung über P₂O₅. Aus Essigester/Petroläther wird umkristallisiert. Ausb. 12.0 g (93 %), Schmp. 178–180°C, $[\alpha]_D^{20} = +0.8^\circ$ (c = 1, Dimethylacetamid).

$C_{21}H_{24}N_4O_6$ (428.45) Ber. C 58.90 H 5.64 N 13.07 Gef. C 57.9 H 5.9 N 13.1

e) *L-Valyl-glycin-o-nitroanilid-hemihydrat*: Zu einer Lösung von 12.0 g (28 mmol) Z-Val-Gly-o-nitroanilid in 150 ml Essigsäure gibt man 60 ml 40proz. HBr/Eisessig, lässt 45 min bei Raumtemp. stehen, engt ein und kristallisiert den Rückstand aus Isopropylalkohol/Äther und anschließend aus Methanol/Äther. Ausb. 6.0 g, Schmp. 203–204°C. Das Hydrobromid wird mit 6 g Na₂CO₃ in Wasser gelöst. Dann wird so lange mit Essigester extrahiert, bis die organische Phase nicht mehr gelb ist. Die vereinigten Essigesterphasen werden über Na₂SO₄ getrocknet und eingeengt. Der Rückstand wird mit Petroläther verrieben. Ausb. 3.0 g gelbe Kristalle (35 %), Schmp. 96–98°C, $[\alpha]_D^{20} = +2.75^\circ$ (c = 1, Methanol).

$C_{13}H_{17}N_4O_4 \cdot 0.5 H_2O$ (302.2) Ber. C 51.64 H 6.00 N 18.54 Gef. C 51.9 H 6.0 N 18.0

f) *Benzylloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-valyl-glycin-o-nitroanilid*: Zu einer Lösung von 300 mg (1 mmol) Z-Phe-OH, 302 mg (1 mmol) H-Val-Gly-o-nitroanilid-hemihydrat und 135 mg (1 mmol) HOBT in 5 ml DMF gibt man bei 0°C 220 mg DCCI, lässt 1 h bei 0°C und über Nacht bei Raumtemp. stehen. Der Niederschlag wird abgesaugt und das Filtrat eingeengt. Der Rückstand wird nacheinander mit NaHCO₃-Lösung, Wasser, 2 N HCl und Wasser verrieben, über P₂O₅ getrocknet und aus Essigester umkristallisiert. Ausb. 450 mg (78 %), Schmp. 209–210°C, $[\alpha]_D^{20} = -18.8^\circ$ (c = 1, Dimethylacetamid).

$C_{30}H_{33}N_5O_7$ (575.5) Ber. C 62.68 H 5.78 N 12.11 Gef. C 62.7 H 6.1 N 12.2

g) *Benzylloxycarbonyl-L-proyl-glycin-o-nitroanilid*: Zu einer Lösung von 7.5 g (30 mmol) Z-Pro-OH, 5.85 g (30 mmol) H-Gly-o-nitroanilid⁷⁾ und 4.05 g (30 mmol) HOBT in 50 ml absol. THF gibt man bei 0°C 6.6 g DCCI in 40 ml THF, röhrt 1 h bei 0°C und 2 h bei Raumtemp. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit DMF weiß gewaschen, das Filtrat eingeengt und der Rückstand zwischen Essigester und NaHCO₃-Lösung verteilt. Die Essigesterphase wird nacheinander mit 2 N HCl, gesätt. NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeengt. Der Rückstand wird mit Äther verrieben. Ausb. 10.3 g gelbe Kristalle (81 %), Schmp. 115–117°C, $[\alpha]_D^{20} = -49.9^\circ$ (c = 1, Dimethylacetamid).

$C_{21}H_{22}N_4O_6$ (426.3) Ber. C 59.16 H 5.20 N 13.14 Gef. C 59.3 H 5.3 N 13.1

h) *L-Prolyl-glycin-o-nitroanilid*: Zu einer Lösung von 9.6 g (22.5 mmol) Z-Pro-Gly-*o*-nitroanilid in 100 ml Essigsäure gibt man 40 ml einer 40 proz. HBr/Eisessig-Lösung. Mit 200 ml Äther wird ein schmieriges Produkt ausgefällt. Das Lösungsmittelgemisch wird dekantiert und der Rückstand aus Methanol/Äther kristallisiert. Ausb. 6.3 g, Schmp. 217–219°C. Das Hydrobromid wird wie bei e) weiterverarbeitet. Ausb. 4.0 g gelbe Kristalle (61%), Schmp. 157–158°C, $[\alpha]_D^{25} = -48.4^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

$C_{13}H_{15}N_4O_4$ (292.3) Ber. C 53.60 H 5.19 N 19.23 Gef. C 53.8 H 5.6 N 19.2

4. *Synthese von Benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-glycyl-L-leucyl-L-valin-amid (5)*

a) *Benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-valin-amid (1)*: Zu einer Lösung von 13 g HBr-*H*-Val-NH₂²⁶⁾ (66 mmol) in 180 ml DMF gibt man 8.91 g HOBr, 8.6 ml *N*-Äthylmorpholin und 30.8 g (60 mmol) Z-Leu-OPcp²⁷⁾. Man röhrt 10 min bei Raumtemp. und engt anschließend i. Hochvak. ein. Der Rückstand wird nacheinander mit 2 N Na_2CO_3 , Wasser, 2.5 proz. $KHSO_4$ -Lösung und Wasser verrührt, abgesaugt und bei 50°C über P_2O_5 getrocknet. Ausb. 21.3 g (98%). Schmp. 236–237°C, $[\alpha]_D^{20} = +6.7^\circ$ ($c = 1$, Dimethylacetamid). Schmp. Lit.²⁸⁾: 231–232°C, Mol.-Masse und Analyse Lit.²⁸⁾ sind abweichend. Schmp. Lit.²⁶⁾: 234–236°C.

$C_{19}H_{29}N_3O_4$ (363.5) Ber. C 62.79 H 8.04 N 11.55 Gef. C 63.0 H 7.8 N 11.5

b) *L-Leucyl-L-valin-amid-hydrochlorid (2)*: Zu einer Suspension von 21 g (57.8 mmol) **1** in einer Mischung aus 200 ml DMF und 200 ml Methanol gibt man $Pd(OH)_2/BaSO_4$ -Katalysator und leitet unter Röhren Wasserstoff hindurch, wobei durch Zutropfen von 1 N methanolischer HCl-Lösung mit Hilfe eines Autotitratoren auf pH 5 gehalten wird. Nachdem keine HCl-Lösung mehr aufgenommen wird, wird der Katalysator abgesaugt und das Filtrat eingeengt. Der Rückstand wird mit Äther verrieben, abgesaugt und bei 50°C getrocknet. Ausb. 15.4 g (100%), Schmp. 138–140°C. Umkristallisation aus Methanol/Äther: Ausb. 14 g (91%), Schmp. 211–213°C, $[\alpha]_D^{20} = +4.5^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

c) *Benzyloxycarbonyl-glycyl-L-leucyl-L-valin-amid (3)*: 15.4 g (57.8 mmol) **2** werden mit 7.52 ml *N*-Äthylmorpholin und 7.8 g (57.8 mmol) HOBr in 120 ml DMF gelöst. Dazu gibt man 22.5 g (57.8 mmol) Z-Gly-OTcp¹⁰⁾, läßt 5 min stehen und engt i. Hochvak. ein. Der Rückstand wird mit 2 N Na_2CO_3 verrieben, abgesaugt und gut mit Wasser gewaschen. Man trocknet über P_2O_5 und kocht dann mit Essigester auf. Zur Reinigung kann aus THF/Petroläther umgefäßt werden. Ausb. 21.8 g (90%), Schmp. 184–186°C, $[\alpha]_D^{20} = -12.8^\circ$ ($c = 1$, Dimethylacetamid) (Lit.²⁶⁾ Schmp. 187–190°C).

$C_{21}H_{32}N_4O_5$ (400.5) Ber. C 60.00 H 7.67 N 13.32 Gef. C 59.6 H 7.4 N 12.6

d) *Glycyl-L-leucyl-L-valin-amid-hydrochlorid (4)*: 20.0 g (47.6 mmol) **3** werden wie bei b) in 200 ml Methanol/DMF (1:1) katalytisch hydriert und aufgearbeitet. Die Substanz ist etwas hygroskopisch und wird zur Reinigung aus Methanol/Äther umgefäßt. Getrocknet wird über P_2O_5 und Paraffinschnitzeln, Ausb. 13.5 g (88%), Schmp. 209–211°C. $[\alpha]_D^{20} = -48.2^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

e) *Benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-glycyl-L-leucyl-L-valin-amid (5)*: Zu einer Lösung von 3.23 g (10 mmol) **4**, 1.3 ml *N*-Äthylmorpholin und 1.35 g (10 mmol) HOBr in 20 ml DMF gibt man 4.0 g (10 mmol) Z-Gln-ONp²⁹⁾ und läßt 10 min stehen. Es fällt eine Gallerte aus. Mit Äther wird verdünnt und die ausgefallene Substanz abgesaugt. Nun wird kurz getrocknet und mit 2 N Na_2CO_3 verrührt, mit Wasser, $KHSO_4$ -Lösung und Wasser gewaschen, über P_2O_5 getrocknet und mit Essigester aufgekocht. Man läßt auf Raumtemp. abkühlen, saugt ab und

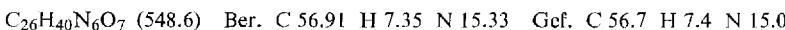
²⁶⁾ M. Bodanszky und N. J. Williams, J. Amer. Chem. Soc. **89**, 685 (1967).

²⁷⁾ G. Kupryszewski und M. Formela, Roczniki Chem. **35**, 1533 (1961).

²⁸⁾ E. Wünsch, G. Wendelberger und A. Högel, Chem. Ber. **104**, 2430 (1971).

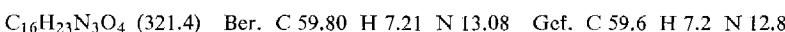
²⁹⁾ M. Bodanszky und V. du Vigneaud, J. Amer. Chem. Soc. **81**, 5688 (1959).

wäscht mit Essigester und Petroläther nach. Bei 40–50°C wird über P₂O₅ und Paraffinschnitzeln getrocknet. Ausb. 5.0 g (91%), Schmp. 242–244°C, $[\alpha]_D^{25} = -25.2^\circ$ (c = 1, Eisessig) (Lit.²⁸) Schmp. 239.5–240.5°C, $[\alpha]_D^{20} = -29.7^\circ$, c = 1, Eisessig; Lit.²⁶ 239–241°C, $[\alpha]_D^{30} = -27^\circ$, c = 2, Eisessig).

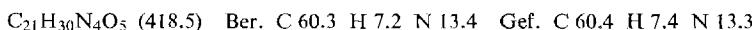


5. *Synthese von Benzyloxycarbonyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycin-amid (8)*

a) *Benzyloxycarbonyl-L-isoleucyl-glycin-amid (6)*: 44.4 g (0.1 mol) Z-Ile-OTcp¹⁰ und 11 g (0.1 mol) HCl·H-Gly-NH₂ werden zusammen mit 1.6 g (10 mmol) 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydrochinazolin und 130 ml N-Äthylmorpholin in 700–800 ml DMF gelöst. Danach wird i. Hochvak. eingeengt, der Rückstand mit NaHCO₃-Lösung verrieben, abgesaugt, mit Wasser gewaschen, getrocknet und zur weiteren Reinigung in DMF gelöst und mit Äther/Petroläther (1:1) gefällt. Ausb. 28.5 g (89%), Schmp. 202°C, $[\alpha]_D^{20} = +8.1^\circ$ (c = 1, Dimethylacetamid).



b) *Benzyloxycarbonyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycin-amid (8)*: Zur Lösung von 20 g (62.2 mmol) 6 in 600 ml Methanol/DMF (3:1) gibt man etwas Pd(OH)₂/BaSO₄-Katalysator und leitet unter Röhren Wasserstoff hindurch, wobei durch Zutropfen von 1 N methanolischer HCl mit Hilfe eines Autotitratoren auf pH 4.5 gehalten wird. Nachdem keine HCl-Lösung mehr aufgenommen wird, wird der Katalysator abgesaugt und das Filtrat eingeengt. Der Rückstand (7) wird in 100 ml DMF gelöst. Dazu gibt man 23 g (62 mmol) Z-Pro-ONp²⁹, 8.1 ml N-Äthylmorpholin und 1.5 g (9.4 mmol) 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydrochinazolin, röhrt 15 min und engt anschließend i. Hochvak. ein. Der Rückstand wird mit Essigester aufgenommen und die Lösung gekühlt. Es fällt ein Niederschlag aus, der abgesaugt und nacheinander mit NaHCO₃-Lösung, 2 N HCl und Wasser verrieben wird. Nun wird getrocknet und zur weiteren Reinigung gut mit Essigester verrieben, abgesaugt und getrocknet. Ausb. 20.7 g (80%), Schmp. 182 bis 184°C, $[\alpha]_D^{22} = -63.2^\circ$ (c = 1, Methanol) (Lit.³⁰) Schmp. 178°C, $[\alpha]_D^{20} = -69.4^\circ$, c = 1.9, Methanol).



6. *Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-valin-methylester*: Zur Lösung von 0.92 g (5.5 mmol) HCl·H-Val-OMe in 10 ml DMF gibt man 865 mg (5.5 mmol) HOEt-Natriumsalz und 2.1 g (5 mmol) Z-Phe-ONp³¹. Man röhrt 5 min, engt i. Hochvak. ein, verteilt den Rückstand zwischen Essigester und 2 N Na₂CO₃, schüttelt einmal mit KHSO₄-Lösung, dreimal mit 2 N Na₂CO₃ und einmal mit Wasser aus, trocknet mit Natriumsulfat, engt ein und verreibt den Rückstand mit Petroläther. Aus Essigester/Petroläther Ausb. 1.65 g (80%), Schmp. 116°C (Lit.⁸) 111–113°C).

Herstellung von HOEt-Natriumsalz: HOEt wird in der äquivalenten Menge 1 N NaOH gelöst. Die Lösung wird eingeengt und der Rückstand aus Methanol/Äther umgefällt. Schmp. >350°C.

7. *Gaschromatographischer Racemisierungstest nach Weygand et al.*^{21,22}.

Herstellung der Ausgangsprodukte

a) *L-Phenylalanin-p-nitrophenylester-hydrobromid*: 4.2 g (10 mmol) Z-Phe-ONp³¹ werden in 10 ml Eisessig suspendiert. Dazu gibt man 10 ml 40 proz. HBr/Eisessig und röhrt 1 h bei Raumtemp. Danach fällt man das Hydrobromid mit viel Äther aus und wäscht gut mit Äther nach. Ausb. 3.5 g (95%), Schmp. 216–219°C.

³⁰ P.-A. Jaquenoud und R. A. Boissonnas, Helv. Chim. Acta **44**, 113 (1961).

³¹ Herstellung analog Lit.²⁹.

b) *L*-Phenylalanin-pentachlorphenylester-hydrobromid: 5.47 g (10 mmol) Z-Phe-OPcp²⁷⁾ werden analog a) behandelt. Ausb. 4.1 g (83 %), Schmp. 205°C (Zers.).

c) *L*-Phenylalanin-2,4,5-trichlorphenylester-hydrobromid: 4.78 g (10 mmol) Z-Phe-OTcp¹⁰⁾ werden analog a) behandelt. Ausb. 4.2 g (99 %), Schmp. 220°C (Zers.).

d) *tert*-Butyloxycarbonyl-*L*-leucyl-*L*-phenylalanin-*p*-nitrophenylester: Die Lösung von 2.49 g Boc-Leu-OH-monohydrat in Essigester wird mit Natriumsulfat getrocknet, eingeengt und der Rückstand i. Hochvak. getrocknet. Er wird in 20 ml absol. THF gelöst und die Lösung auf -10°C abgekühlt. Unter Rühren lässt man nun bei Eiskühlung 1.2 ml *N*-Äthylmorpholin und anschließend eine Lösung von 1.27 g Chlorameisensäure-isobutylester in wenig kaltem THF zutropfen. Man röhrt 10 min bei -10°C, gibt dann 3.35 g (9.1 mmol) HBr·H-Phe-ONp zu, lässt langsam eine Lösung von 1.2 ml *N*-Äthylmorpholin in 5 ml THF zutropfen, lässt noch 1 h bei 0°C und 1 h bei Raumtemp. nachröhren, saugt vom Niederschlag ab, engt das Filtrat ein und verreibt den Rückstand mit Isopropylalkohol. Ausb. 3.77 g, Schmp. 150 bis 152°C. Aus Isopropylalkohol Ausb. 3.10 g (68 %), Schmp. 152-153°C, $[\alpha]_D^{20} = -32.2^\circ$ ($c = 1$, Dimethylacetamid).

$C_{26}H_{33}N_3O_7$ (499.6) Ber. C 62.5 H 6.66 N 8.41 Gef. C 62.4 H 7.1 N 8.7

e) *tert*-Butyloxycarbonyl-*L*-leucyl-*L*-phenylalanin-pentachlorphenylester: Aus 1.97 g Boc-Leu-OH-monohydrat, 0.93 ml *N*-Äthylmorpholin und 1.0 g Chlorameisensäure-isobutylester wird analog d) das gemischte Anhydrid hergestellt, das analog d) mit 3.55 g (7.2 mmol) HBr·H-Phe-OPcp und 0.93 ml *N*-Äthylmorpholin umgesetzt wird. Ausb. 3.35 g, Schmp. 145-147°C. Aus Isopropylalkohol Ausb. 2.11 g (47 %), Schmp. 163-164°C, $[\alpha]_D^{20} = -29.1^\circ$ ($c = 1$, Dimethylacetamid).

$C_{26}H_{29}Cl_5N_2O_5$ (626.8) Ber. C 49.2 H 4.66 Cl 28.28 N 4.46
Gef. C 49.9 H 4.6 Cl 28.1 N 4.7

f) *tert*-Butyloxycarbonyl-*L*-leucyl-*L*-phenylalanin-2,4,5-trichlorphenylester: Aus 2.3 g Boc-Leu-OH-monohydrat, 1.1 ml *N*-Äthylmorpholin und 1.17 g Chlorameisensäure-isobutylester wird analog d) das gemischte Anhydrid hergestellt, das analog d) mit 3.6 g (8.5 mmol) HBr·H-Phe-OTcp und 1.1 ml *N*-Äthylmorpholin umgesetzt wird. Ausb. 3.7 g, Schmp. 143-145°C. Aus Isopropylalkohol Ausb. 3.2 g (67 %), Schmp. 150-151°C, $[\alpha]_D^{20} = -48.4^\circ$ ($c = 1$, Dimethylacetamid).

$C_{26}H_{31}Cl_3N_2O_5$ (557.9) Ber. C 55.97 H 5.60 Cl 19.06 N 5.02
Gef. C 55.9 H 5.5 Cl 19.2 N 5.3

*Allgemeine Vorschrift zur Herstellung von *tert*-Butyloxycarbonyl-*L*-leucyl-*L*-phenylalanyl-*L*-valin-*tert*-butylester aus den *tert*-Butyloxycarbonyl-*L*-leucyl-*L*-phenylalanin-Aktivestern:* Zu einer Lösung von 105 mg (0.5 mmol) HCl·H-Val-OBu^t in 2.5 ml 0.2 M *N*-Äthylmorpholin/Dimethylacetamid-Lösung gibt man den katalysierenden Zusatz und 0.5 mmol des entsprechenden Boc-Leu-Phe-Aktivesters (250 mg Boc-Leu-Phe-ONp, 313 mg Boc-Leu-Phe-OPcp, 279 mg Boc-Leu-Phe-OTcp). Man lässt die in Tab. 3 angegebene Zeit stehen, verdünnt mit 50 ml Essigester, schüttelt die Essigesterlösung mit NaHCO₃-Lösung, KHSO₄-Lösung, NaHCO₃-Lösung und NaCl-Lösung aus, trocknet mit Natriumsulfat und engt ein. Der Rückstand wird, wie schon früher beschrieben^{21, 22)}, partialhydrolysiert, trifluoracetyliert und gaschromatographiert. Die Ergebnisse der gaschromatographischen Racemisierungsermittlung sind in Tab. 3 zusammengefaßt.