

Zur Synthese von Peptiden mit Eigenschaften des Human-Proinsulin-C-Peptids (_hC-Peptid), I

Syntheseplan und Darstellung der Sequenz 28–31 des Human-Proinsulin-C-Peptids

Rolf Geiger, Georg Jäger, Wolfgang König und Gerda Treuth*

Farbwerke Höchst AG, vormals Meister Lucius & Brüning,
D-6230 Frankfurt-Höchst, Postfach 800320

Eingegangen am 12. September 1972

Zur Synthese des h C-Peptids werden Fragmente hergestellt, aus denen sukzessive vom Carboxylen her das Hentriacontapeptid aufgebaut wird. Die vorliegende Arbeit beschreibt den Syntheseplan und die Darstellung der geschützten Sequenz 28–31, H-Gly-Ser(Bu t)-Leu-Gln-OBu t1) (C^B 29-*tert*-Butyl-Human-Proinsulin-C-Peptid-(28-31)-tetrapeptid-*tert*-butylester).

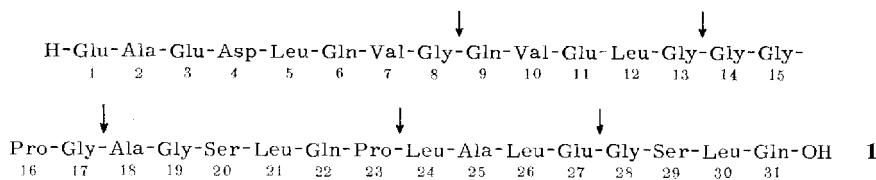
Notes on the Synthesis of Peptides with the Properties of Human Proinsulin C-Peptide (C-Peptide), I

Plan of the Synthesis and Preparation of the Sequence 28-31

For the synthesis of hC -peptide fragments are prepared, from which the hentriacontapeptide is built up successively, beginning at the carboxyl end. The present paper describes the plan of the synthesis and the preparation of the protected sequence 28–31, H-Gly-Ser(Bu t)-Leu-Gln-OBu t t (C^{β} 29- t -butyl-human proinsulin C-peptide-(28-31)-tetrapeptide t -butylester).

Die Entdeckung des Proinsulins durch *Steiner* und *Oyer*²⁾ warf eine Reihe von Fragen auf, die auch die Rolle des C-Peptids betrafen, das im Proinsulin die Brücke zwischen Insulin-B- und -A-Kette bildet und neben Insulin aus der β -Zelle des Pankreas sezerniert wird.

Der Isolierung von C-Peptid aus menschlichem Pankreas stehen wegen der schweren Zugänglichkeit des biologischen Materials und der schon vor der Aufarbeitung beginnenden Autolyse große Hindernisse entgegen. Dennoch konnte eine für die Konstitutionsaufklärung hinreichende Menge der reinen Substanz erhalten und die Aminosäuresequenz ermittelt werden^{3,4)}:



¹¹) Abkürzungen entsprechen dem Vorschlag der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature; vgl. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **348**, 245, 256, 262 (1967). Weitere Abkürzungen siehe experimenteller Teil.

²⁾ D. F. Steiner und P. E. Oyer, Proc. nat. Acad. Sci. USA **57**, 473 (1967).

³³) P. E. Oyer, S. Cho, J. D. Peterson und D. F. Steiner, J. biol. Chemistry **246**, 1375 (1971).

⁴⁾ A. S. C. Ko, D. G. Smyth, J. Markussen and F. Sundby, *Europ. J. Biochem.*, **20**, 190 (1971).

Das für weitere Experimente benötigte Material versuchten wir auf synthetischem Wege herzustellen und berichten im folgenden über den Verlauf unserer Synthesen.

Wir benützten ausschließlich die klassischen Verfahren der Peptidchemie mit der auf *Schwyzer* zurückgehenden Strategie, funktionelle Gruppen in den Seitenketten der Aminosäuren durch die protonensolvolytisch abspaltbaren *tert*-Butoxy- und *tert*-Butyl-Reste zu blockieren. α -Aminogruppen wurden durch den hydrogenolytisch abspaltbaren Benzyloxycarbonyl-Rest geschützt, den wir auch bei der Synthese von Peptiden aus der Sequenz des Schweine-Proinsulins mit Erfolg verwendet hatten⁵⁾. Nur in einem Fall, bei dem sterische Hinderung zu befürchten war, wurde der 2-Nitrophenylsulfenyl-Rest zum Schutz der α -Aminogruppe eingesetzt. Das *N*-terminale Octapeptid (1-8) trug als *N*²-Schutzgruppe den *tert*-Butoxycarbonyl-Rest.

Zur Kondensation der Fragmente wurde die Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol-Methode (DCC/HOBt)⁶⁾ angewandt.

In Formel 1 sind die Knüpfungsstellen durch Pfeile gekennzeichnet. Tab. 1 führt die Fragmente in geschützter Form, in der sie sukzessive zur Kondensation eingesetzt werden, auf.

Tab. 1. Geschützte Peptid-Fragmente zur Synthese des h C-Peptids und seines [Glu⁹, Gln¹¹]-Analogen

H-Gly-Ser(Bu ^t)-Leu-Gln-OBu ^t	(28-31)
Z-Leu-Ala-Leu-Glu(OBu ^t)-OH	(24-27)
Z-Ala-Gly-Ser(Bu ^t)-Leu-Gln-Pro-OH	(18-23)
Z-Gly-Gly-Pro-Gly-OH	(14-17)
Z-Glu(OBu ^t)-Val-Gln-Leu-Gly-OH	(9-13) a
Nps-Gln(Mbh)-Val-Glu(OBu ^t)-OH	(9-13) b
Boc-Glu(OBu ^t)-Ala-Glu(OBu ^t)-Asp(OBu ^t)-Leu-Gln-Val-Gly-OH	(1-8)

Die Sequenz 9-13 mußte in zwei Varianten hergestellt werden, da aufgrund einer früheren Publikation⁷⁾ in Position 9 Glutaminsäure und in Position 11 Glutamin erwartet worden war. Nach Kenntnis der endgültigen Strukturformel^{3,4)} wurde die Synthese entsprechend umgestellt. Allerdings war nun die Kupplungsstelle zwischen den Positionen 8 und 9 mit Glutamin in Stellung 9 wegen der Gefahr der Cyclisierung von Glutamin zu Pyroglutaminsäure denkbar ungünstig. Wir begegneten ihr durch Verwendung des 4,4'-Dimethoxybenzhydryl-Restes (Mbh)⁸⁾ als Amidschutzgruppe für Glutamin und des 2-Nitrophenylsulfenyl-Restes (Nps) als α -Amino-Schutzgruppe, um mögliche Schwierigkeiten bei der hydrogenolytischen Abspaltung der Benzyloxycarbonyl-Gruppe zu vermeiden.

Auch die Synthese des analogen [Glu⁹, Gln¹¹]_hC-Peptides wurde weitergeführt, um klären zu können, ob sich eine solche Umstellung im antigenen Verhalten niederschlagen würde.

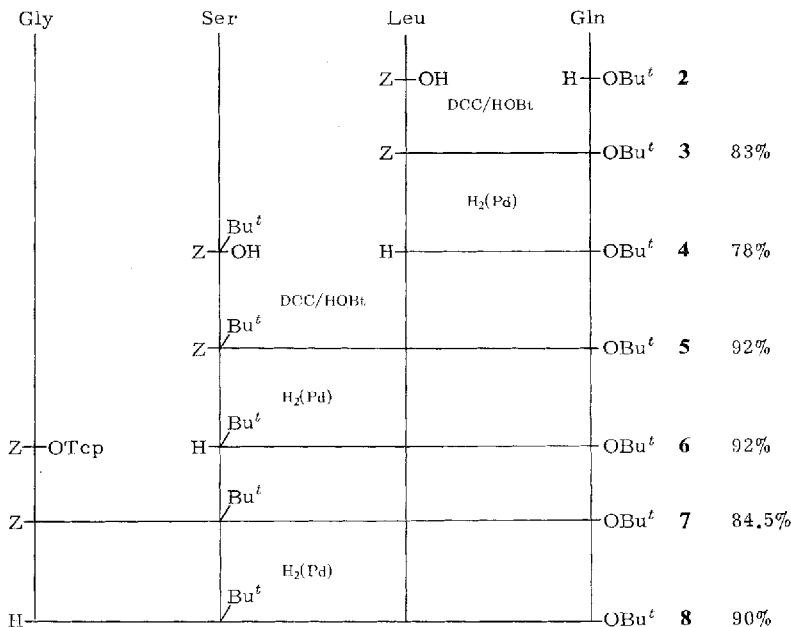
⁵⁾ R. Geiger, G. Jäger, W. König und A. Volk, Z. Naturforsch. **24b**, 999 (1969).

⁶⁾ W. König und R. Geiger, Chem. Ber. **103**, 788 (1970).

⁷⁾ P. E. Oyer, S. Cho und D. F. Steiner, Federat. Proc. **29**, 533 (1970).

⁸⁾ W. König und R. Geiger, Chem. Ber. **103**, 2041 (1970).

Schema 1. Synthese der geschützten Sequenz 28-31



Schema 1 zeigt die Synthese der geschützten Sequenz 28–31. Ausgehend von Z-Gln-OBu^t⁹) wird das Peptid stufenweise aufgebaut. Zur Kondensation mit Z-Leu-OH bzw. Z-Ser(Bu^t)-OH¹⁰) wird DCC/HOBt⁶) verwendet, Z-Gly-OH wird als 2,4,5-Trichlorphenylester¹¹) aktiviert.

Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren bestimmt und sind nicht korrigiert. Die Drehwerte wurden im lichtelektrischen Polarimeter Mod. 141 der Fa. Perkin-Elmer gemessen, die chromatographische Reinheit auf Dünnschichtplatten der Fa. E. Merck in folgenden Laufmitteln geprüft:

A Methyläthylketon/Pyridin-Wasser/Essigsäure (70 : 15 : 15 : 2), B n-Butanol/Essigsäure/Wasser (6 : 2 : 2), C n-Heptan/Pyridin/*tert*-Butylalkohol (5 : 1 : 1).

Abkürzungen:

Nps	2-Nitrophenylsulfonyl	HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
OTcp	2,4,5-Trichlorphenylester	TosOH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid		

1. *L*-Glutamin-*tert*-butylester·HCl (**2**): 101 g (0.3 mol) Z-Gln-OBu^t⁹) werden in 3 l Methanol an Palladiumschwarz unter gleichzeitiger automatischer Titration mit 2N methanol. HCl bei pH 4.5 katalytisch hydriert. Nach Aufnahme von etwa 145 ml 2N HCl wird vom

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

10) E. Wünsch und J. Jentsch, Chem. Ber. **97**, 2490 (1964).

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

Katalysator abfiltriert, das Filtrat i. Vak. abdestilliert und der Rückstand aus Isopropylalkohol umkristallisiert. Ausb. 49.5 g (69%); DC: Rein in System B; $[\alpha]_D^{22} = -15.6^\circ$ ($c = 1$, in Methanol).

2. *Benzylloxycarbonyl-L-leucyl-L-glutamin-tert-butylester* (3): Zu einer Lösung von 47.7 g (0.2 mol) 2, 53.0 g (0.2 mol) Z-Leu-OH und 27.0 g (0.2 mol) HOBT in 500 ml DMF gibt man bei 0° 25.6 ml (0.2 mol) N-Äthylmorpholin und 43.3 g (0.21 mol) DCC. Nach 6 h Röhren bei Raumtemp. wird vom Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und das Lösungsmittel bei 1 Torr abdestilliert. Den Rückstand nimmt man in 350 ml Essigester auf, wäscht die Lösung nacheinander je zweimal mit 5proz. KHSO_4 -Lösung¹²⁾, gesätt. NaHCO_3 -Lösung und Wasser, trocknet über Na_2SO_4 und destilliert den Essigester i. Vak. ab. Der gallertige Rückstand wird mit Äther verrieben, abfiltriert und i. Vak. über P_2O_5 getrocknet. Ausb. 74.6 g (83%). DC: Rein in System B und C; $[\alpha]_D^{20} = -34.8^\circ$ ($c = 1$, in Methanol). Zur Analyse wird aus Isopropylalkohol/Petroläther umkristallisiert. Schmp. 116–118°.

$\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_6$ (449.5) Ber. C 61.45 H 7.85 N 9.36 Gef. C 61.3 H 7.9 N 9.3

3. *L-Leucyl-L-glutamin-tert-butylester · TosOH* (4): 67.4 g 3 werden in 1 l Methanol unter Titration mit 2N methanol. TosOH bei pH 4.5 analog Versuch 1. katalytisch hydriert. Das Reaktionsprodukt wird aus Acetonitril umkristallisiert. Ausb. 57.0 g (78%). DC: Rein in System B. Schmp. 156–158°. $[\alpha]_D^{20} = -6.8^\circ$ ($c = 1$, in Methanol).

$\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_4\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_3\text{S}$ (487.6) Ber. C 54.20 H 7.65 N 8.62 S 6.58
Gef. C 54.0 H 7.6 N 8.8 S 6.4

4. *Benzylloxycarbonyl-O-tert-butyl-L-seryl-L-leucyl-L-glutamin-tert-butylester* (5): Man gibt zur Lösung von 29.5 g (0.1 mol) Z-Ser(Bu^t)-OH¹⁰⁾, 48.8 g (0.1 mol) 4 und 1.35 g (0.1 mol) HOBT in 300 ml DMF bei 0° 12.8 ml (0.1 mol) N-Äthylmorpholin und 22.5 g (0.11 mol) DCC zu und röhrt 5 h bei Raumtemp. Dann filtriert man vom Dicyclohexylharnstoff ab, bringt das Filtrat bei 1 Torr zur Trockene und nimmt den Rückstand in 300 ml Essigester auf. Die Essigesterlösung wird nacheinander je zweimal mit 5proz. KHSO_4 -Lösung, gesätt. NaHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Man destilliert den Essigester i. Vak. ab und kristallisiert den Rückstand aus Isopropylalkohol/Diisopropyläther um. Das leicht gallertige Produkt wiegt 54.5 g (92%). DC: Rein in System C; $[\alpha]_D^{21} = -33.9^\circ$ ($c = 1$, in Methanol).

$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_8$ (592.7) Ber. C 60.79 H 8.17 N 9.45 Gef. C 60.6 H 8.1 N 9.45

5. *O-tert-Butyl-L-seryl-L-leucyl-L-glutamin-tert-butylester · TosOH* (6): 54 g (0.09 mol) 5 werden in 400 ml Methanol unter Zugabe von 2N methanol. TosOH bei pH 4.5 analog Versuch 3. katalytisch hydriert. Das Reaktionsprodukt ist schaumig und wird zur Reinigung kurz mit Acetonitril in der Wärme verrieben. Nach Abkühlen wird abfiltriert und mit Acetonitril gewaschen. Trocknen i. Vak. über P_2O_5 . Ausb. 52.2 g (92%). DC: Rein in System A. Schmp. 183–184° (Zers.). $[\alpha]_D^{20} = -24.7^\circ$ ($c = 1$, in Methanol).

$\text{C}_{22}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_6\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_3\text{S}$ (630.8) Ber. C 55.21 H 7.99 N 8.88 S 5.08
Gef. C 55.4 H 7.9 N 8.9 S 5.1

6. *Benzylloxycarbonyl-glycyl-O-tert-butyl-L-seryl-L-leucyl-L-glutamin-tert-butylester* (7): 50.5 g (0.08 mol) 6 und 38.8 g (0.1 mol) Z-Gly-OTCP¹¹⁾ werden in 500 ml DMF mit 10.25 ml (0.08 mol) N-Äthylmorpholin versetzt und 24 h bei Raumtemp. gerührt. Man destilliert das Lösungsmittel bei 1 Torr ab, nimmt den Rückstand in Essigester auf, wäscht die Lösung nacheinander je zweimal mit 5proz. KHSO_4 -Lösung, gesätt. NaHCO_3 -Lösung und Wasser, trock-

¹²⁾ R. Spangenberg, P. Thamm und E. Wünsch, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **352**, 655 (1971).

net über Na_2SO_4 und destilliert den Essigester i. Vak. ab. Der Rückstand wird gründlich mit Äther verrieben. Ausb. nach Trocknen i. Hochvak. über P_2O_5 und KOH 44.0 g (84.5%). DC: In System B bis auf eine Spur Trichlorphenol rein. Schmp. 139–142°.

$\text{C}_{32}\text{H}_{51}\text{N}_5\text{O}_9$ (649.8) Ber. C 59.20 H 7.92 N 10.78 Cl 0.0
Gef. C 58.7 H 7.8 N 10.5 Cl 0.8

7. *Glycyl-O-tert-butyl-L-seryl-L-leucyl-L-glutamin-tert-butylester · TosOH · H₂O* (8): 43 g (66 mmol) 7 werden in 1 l Methanol unter Zugabe von 1N methanol. TosOH bei pH 4.5 analog Versuch 3. katalytisch hydriert. Das Reaktionsprodukt ist schaumig und leicht hygrokopisch. Es wird mit Äther digeriert, nach mehrstündigem Stehenlassen unter Äther abfiltriert und über KOH und P_2O_5 i. Vak. getrocknet. Ausb. 42 g (90%). DC: Rein in System B; $[\alpha]_D^{20} = -33.8^\circ$ ($c = 1$, in Methanol).

$\text{C}_{24}\text{H}_{46}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}$ (705.9) Ber. C 52.78 H 7.85 N 9.93 S 4.55
Gef. C 53.0 H 7.9 N 10.0 S 4.5

[342/72]