

Zur Synthese von Peptiden mit Eigenschaften des Human-Proinsulin-C-Peptids ($_{\text{h}}$ C-Peptid), II¹⁾

Darstellung der Sequenzen 18—23 und 24—27 des Human-Proinsulin-C-Peptids

Wolfgang König

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

Eingegangen am 12. September 1972

Die Synthese von Z-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-OH (N^{α} -Benzyloxycarbonyl-Human-Proinsulin-C-Peptid-(18-23)-hexapeptid) und Z-Leu-Ala-Leu-Glu(OBu^t)-OH (N^{α} -Benzyloxycarbonyl-CY²⁷-*tert*-butoxy-Human-Proinsulin-C-Peptid-(24-27)-tetrapeptid) wird beschrieben.

Notes on the Synthesis of Peptides with the Properties of Human Proinsulin C-Peptide ($_{\text{h}}$ C-Peptide), II¹⁾

Synthesis of the Sequences 18—23 and 24—27 of Human Proinsulin C-Peptide

The syntheses of Z-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-OH (N^{α} -benzyloxycarbonyl-human proinsulin C-peptide-(18-23)-hexapeptide) and Z-Leu-Ala-Leu-Glu(OBu^t)-OH (N^{α} -benzyloxycarbonyl-CY²⁷-*t*-butoxy-human proinsulin C-peptide-(24-27)-tetrapeptide) are described.

Im Rahmen der Synthese des Human-Proinsulin-C-Peptids¹⁾ wird hier die Darstellung von Z-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-OH (**6**) und Z-Leu-Ala-Leu-Glu(OBu^t)-OH (**9**) beschrieben.

1. Z-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-OH (**6**) ist das N^{α} -Benzyloxycarbonyl-Human-Proinsulin-C-Peptid-(18-23)-hexapeptid, das der Sequenz 50—55 des Human-Proinsulins entspricht. Wie das Schema 1 zeigt, wurde das Hexapeptid durch Kondensation von drei Dipeptiden gewonnen.

Um eine bessere Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln zu erreichen und um Nebenreaktionen zu vermeiden, wurden die γ -Amidfunktion des Glutamins mit dem 4,4'-Dimethoxybenzhydryl-Rest²⁾ und die Hydroxygruppe des Serins mit dem *tert*-Butyl-Rest^{3,4)} geschützt. Durch die 4,4'-Dimethoxybenzhydryl-Gruppe wird aminoständiges Glutamin stabilisiert; es neigt nicht mehr zur Bildung von Pyroglutamylpeptiden, die sonst oft als Verunreinigungen auftreten.

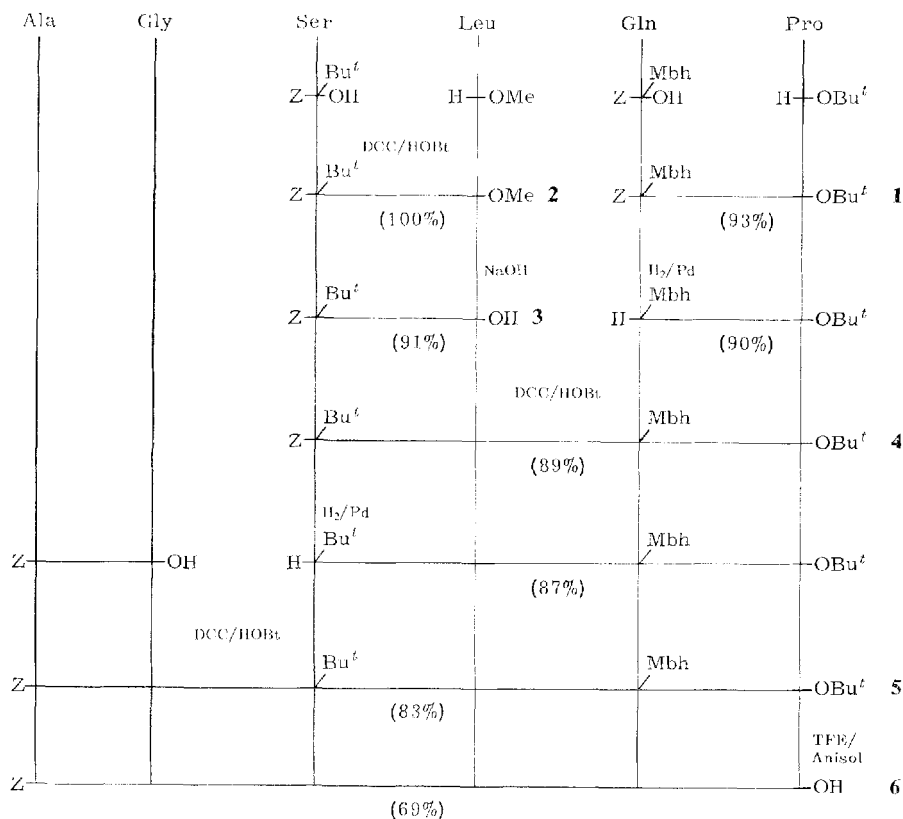
¹⁾ I. Mitteil.: R. Geiger, G. Jäger, W. König und G. Treuth, Chem. Ber. **106**, 188 (1973), vorstehend.

²⁾ W. König und R. Geiger, Chem. Ber. **103**, 2041 (1970).

³⁾ G. W. Anderson und F. M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. **82**, 3359 (1960).

⁴⁾ E. Wünsch und J. Jentsch, Chem. Ber. **97**, 2490 (1964).

Schema 1. Synthese der geschützten Sequenz 18-23



Zur Synthese der Dipeptide und zur Verknüpfung dieser Dipeptide zum Hexapeptid wurde ausschließlich die Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol-Methode (DCC/HOBt)⁵⁾ herangezogen. Das voll geschützte Hexapeptid **5** wurde 2 h bei Raumtemperatur mit Trifluoressigsäure/Anisol (10 : 1) behandelt. Dabei spalteten sich die *tert*-Butyl-Gruppen und der 4,4'-Dimethoxybenzhydryl-Rest unter Erhaltung des *N* α -Benzyloxycarbonyl-Restes ab, und es entstand **6**.

2. Z-Leu-Ala-Leu-Glu(OBu^t)-OH (9) ist das *N* α -Benzyloxycarbonyl-C²⁷-*tert*-butoxy-Human-Proinsulin-C-Peptid-(24-27)-tetrapeptid, das der Sequenz 56–59 des Human-Proinsulins entspricht. Diese Sequenz ist identisch mit dem Schweine-Proinsulin-C-Fragment-(24-27)-tetrapeptid, das von uns schon früher im Rahmen der Synthese des Schweine-Proinsulin-(31-63)-triacontatripeptids⁶⁾ beschrieben wurde.

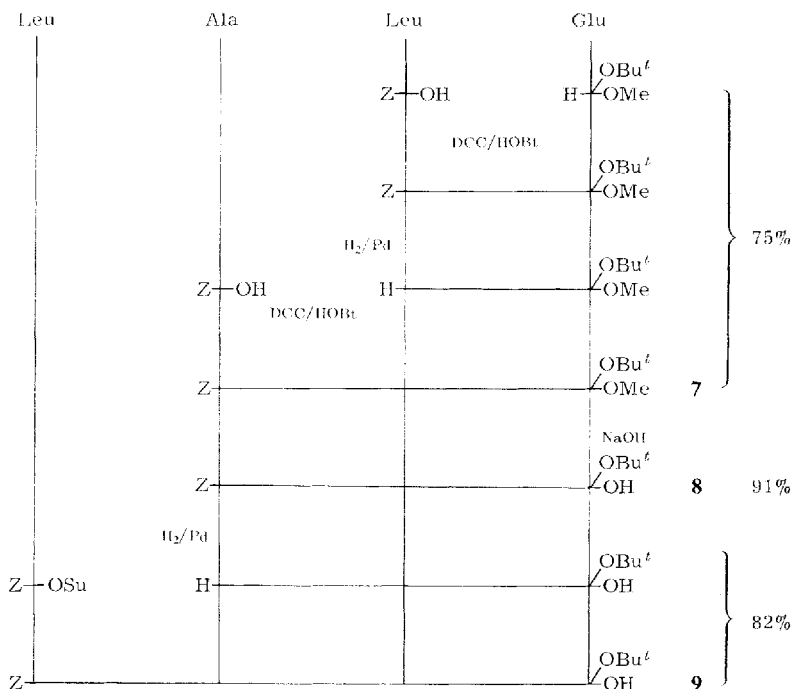
Das Tripeptid Z-Ala-Leu-Glu(OBu^t)-OMe (**7**) wurde nun jedoch auf andere Weise hergestellt. In unserer früheren Synthese verknüpften wir Z-Ala-Leu-OH mit H-Glu-

⁵⁾ W. König und R. Geiger, Chem. Ber. **103**, 788 (1970).

⁶⁾ R. Geiger, G. Jäger, W. König und A. Volk, Z. Naturforsch. **24b**, 999 (1969).

(OBu^t)-OMe mittels DCC und *N*-Hydroxysuccinimid⁷⁾. Bei der Neusynthese wurde das Peptid, wie das Schema 2 zeigt, schrittweise aufgebaut.

Schema 2. Synthese der geschützten Sequenz 24-27



Während unsere erste Synthese eine Gesamtausbeute von ca. 60% lieferte, erbrachte der neue Weg ca. 75%. Die weitere Umsetzung zum Tetrapeptid entsprach der früheren Synthese.

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.

Abkürzungen:

OSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimidester	Mbh	4,4'-Dimethoxybenzhydryl
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid	HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
DCHA	Dicyclohexylamin		

1. Benzylloxycarbonyl-*N*^γ-(4,4'-dimethoxybenzhydryl)-*L*-glutaminyl-*L*-prolin-*tert*-butylester (1): Zu einer Lösung von 50.6 g (0.1 mol) Z-Gln(Mbh)-OH²⁾, 20.7 g (0.1 mol) HCl·H-Pro-OBu^t (durch Hydrieren von Z-Pro-OBu^t³⁾ bei gleichzeitiger Zugabe von methanol. HCl bei

⁷⁾ E. Wünsch und F. Drees, Chem. Ber. **99**, 110 (1966); F. Weygand, D. Hoffmann und E. Wünsch, Z. Naturforsch. **21b**, 426 (1966).

pH 4.5 hergestellt, Schmp. 92—102°) und 27 g (0.2 mol) HOBt in 200 ml DMF gibt man 13 ml *N*-Äthylmorpholin und bei 0° eine kalte Lösung von 22 g DCC in DMF. Man läßt 1 h bei 0° und 1 h bei Raumtemp. rühren, saugt den Niederschlag ab und engt das Filtrat i. Vak. ein. Der Rückstand wird zwischen Essigester und gesätt. NaHCO₃-Lösung verteilt. Die organische Phase wird abgetrennt und nacheinander mit 2*N* Citronensäure, gesätt. NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Zur weiteren Reinigung wird die Substanz in Essigester über 200 g basisches Al₂O₃ (Woelm, Akt.-Stufe I) chromatographiert. Das Eluat wird eingeeengt und der Rückstand mit Petroläther verrieben. Ausb. 61.7 g (93%), Schmp. 65—70° (unter Zers.), $[\alpha]_D^{25}$: -25.5° (*c* = 1, in Dimethylacetamid).

C₃₇H₄₅N₃O₈ (659.8) Ber. C 67.34 H 6.87 N 6.38 Gef. C 67.7 H 7.00 N 6.1

2. *Benzoyloxycarbonyl-O-tert-butyl-L-seryl-L-leucyl-N'-(4,4'-dimethoxybenzhydryl)-L-glutaminyl-L-prolin-tert-butylester* (4)

a) *Benzoyloxycarbonyl-O-tert-butyl-L-seryl-L-leucin-methylester* (2): 50 g (105 mmol) Z-Ser(Bu^t)-OH·DCHA⁴⁾ werden bei 0° zwischen Äther und 2*N* Citronensäure verrührt, bis alles gelöst ist. Die äther. Phase wird abgetrennt, zweimal mit Wasser ausgeschüttelt, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Zur Lösung des Rückstandes in 200 ml absol. Tetrahydrofuran gibt man 18.1 g (100 mmol) HCl·H-Leu-OMe⁸⁾, 13 ml *N*-Äthylmorpholin, 27 g HOBt und bei 0° eine kalte Lösung von 22 g DCC in Tetrahydrofuran. Man rührt 1 h bei 0° und 1 h bei Raumtemp., saugt den Niederschlag ab und engt das Filtrat ein. Der Rückstand wird zwischen Essigester und NaHCO₃-Lösung verteilt. Die organische Phase wird abgetrennt, nacheinander mit 2*N* Citronensäure, gesätt. NaHCO₃-Lösung und Wasser ausgeschüttelt, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Ausb. 43.8 g Öl.

b) *Benzoyloxycarbonyl-O-tert-butyl-L-seryl-L-leucin* (3): Die Lösung des nach 2a) erhaltenen Öls in 250 ml Dioxan/Wasser (8 : 2) wird mit wenig Thymolphthalein versetzt. Man gibt bis zur bleibenden Blaufärbung portionsweise 1*N* NaOH zu. Nach beendeter Verseifung wird mit 2*N* HCl neutralisiert und eingeeengt. Der Rückstand wird bei 0° zwischen 2*N* Citronensäure und Äther verteilt. Die äther. Phase wird mit Wasser ausgeschüttelt, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Ausb. 37.4 g Öl (91%, bezogen auf HCl·H-Leu-OMe).

c) *Benzoyloxycarbonyl-O-tert-butyl-L-seryl-L-leucyl-N'-(4,4'-dimethoxybenzhydryl)-L-glutaminyl-L-prolin-tert-butylester* (4): Durch die Lösung von 61.7 g (93.5 mmol) Z-Gln(Mbh)-Pro-OBu^t (1) in 500 ml Methanol, der man etwas Pd(OH)₂/BaSO₄-Katalysator zugesetzt hat, leitet man Wasserstoff, wobei durch Zutropfen von 1*N* methanol. HCl mit Hilfe eines Autotitrators pH 4.5 gehalten wird. Nach beendeter Hydrierung wird der Katalysator abfiltriert, das Filtrat wird eingeeengt und der Rückstand mit Äther verrieben. Es bleiben 47 g amorphe Substanz zurück (90%). Diese 47 g werden zusammen mit 34.4 g (85 mmol) Z-Ser(Bu^t)-Leu-OH (3), 10.9 ml (85 mmol) *N*-Äthylmorpholin und 28.1 g HOBt in 400 ml DMF gelöst. Bei 0° gibt man 23 g (110 mmol) DCC, gelöst in kaltem DMF, zu, läßt 1 h bei 0° und 1 h bei Raumtemp. rühren, saugt den Niederschlag ab und engt das Filtrat i. Vak. ein. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen. Die Lösung wird filtriert, mit NaHCO₃-Lösung, 2*N* Citronensäure, NaHCO₃-Lösung und Wasser extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wird mit Petroläther verrieben. Zur Reinigung wird in Essigester über 250 g basisches Al₂O₃ (Woelm, Akt.-Stufe I) chromatographiert. Ausb. 68.75 g (80%, bezogen auf Z-Gln(Mbh)-Pro-OBu^t), amorph, $[\alpha]_D^{20}$: -25.6° (*c* = 1, in Dimethylacetamid).

C₅₀H₆₉N₅O₁₁ (916.1) Ber. C 65.56 H 7.59 N 7.64 Gef. C 66.0 H 8.00 N 7.6

3. *Benzoyloxycarbonyl-L-alanyl-glycyl-O-tert-butyl-L-seryl-L-leucyl-N'-(4,4'-dimethoxybenzhydryl)-L-glutaminyl-L-prolin-tert-butylester* (5): Durch die Lösung von 68.75 g (75 mmol) 4

⁸⁾ M. Brenner und W. Huber, Helv. chim. Acta 36, 1109 (1953).

in Methanol, der man etwas $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{BaSO}_4$ -Katalysator zugesetzt hat, leitet man Wasserstoff, wobei durch Zutropfen von 1N methanol. HCl mit Hilfe eines Autotitrators pH 4.5 gehalten wird. Nach beendeter Hydrierung wird der Katalysator abgesaugt. Das Filtrat wird eingengt, der Rückstand mit Äther verrichen und abgesaugt. Zur Lösung der amorphen Substanz (53.55 g) zusammen mit 21.0 g (75 mmol) Z-Ala-Gly-OH⁹⁾ in 300 ml DMF gibt man 9.6 ml (75 mmol) *N*-Äthylmorpholin, 20.2 g (150 mmol) HOBT und bei 0° eine kalte Lösung von 16.4 g (80 mmol) DCC in DMF. Zur Aufarbeitung wird wie bei Beispiel 1. verfahren. Ausb. 57 g (73 %, bezogen auf 4). Zers. ab 108°; $[\alpha]_D^{20}$: -25.5° ($c = 1$, in Dimethylacetamid).

$\text{C}_{55}\text{H}_{77}\text{N}_7\text{O}_{13}$ (1044.3) Ber. C 63.26 H 7.43 N 9.39 Gef. C 63.3 H 7.7 N 9.2

4. *Benzoyloxycarbonyl-L-alanyl-glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-glutaminyll-L-prolin* (6): Die Lösung von 30 g 5 und 10 ml Anisol in 100 ml Trifluoressigsäure läßt man bei Raumtemp. 2 h stehen und engt anschließend bei einer Badtemp. von 20° i. Vak. ein. Der Rückstand wird mit Äther verrichen und abgesaugt. Man fällt aus Aceton/Petroläther um. Die Verbindung kristallisiert aus Isopropylalkohol. Ausb. 14.3 g (69 %), Zers. ab 181°; $[\alpha]_D^{20}$: -34.0° ($c = 1$, in Dimethylacetamid).

$\text{C}_{32}\text{H}_{47}\text{N}_7\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (723.8) Ber. C 53.11 H 6.82 N 13.55 Gef. C 53.2 H 7.1 N 13.3

5. *Benzoyloxycarbonyl-L-alanyl-L-leucyl-L-glutaminsäure(γ-tert-butylester)-methylester* (7): Zu einer auf 0° abgekühlten Lösung von 26.5 g (0.1 mol) Z-Leu-OH¹⁰⁾ und 27 g (0.2 mol) HOBT in 200 ml Tetrahydrofuran gibt man 25.4 g (0.1 mol) $\text{HCl} \cdot \text{H-Glu}(\text{OBu}^t)\text{-OMe}^{11)}$, 12.8 ml (0.1 mol) *N*-Äthylmorpholin und danach eine eiskalte Lösung von 22 g (0.106 mol) DCC in etwas Tetrahydrofuran. Man läßt 1 h bei 0° und 1 h bei Raumtemp. rühren, saugt den Niederschlag ab und engt das Filtrat ein. Der Rückstand wird wie in Beispiel 1. aufgearbeitet und zur Reinigung in Essigester über basisches Al_2O_3 (Woelm, Akt.-Stufe I) chromatographiert. Ausb. 44.85 g Öl (96.6 %). Die Verbindung wird in Methanol, wie in Beispiel 2. c) beschrieben, katalytisch hydriert. Das resultierende Dipeptidester-hydrochlorid (34.8 g = 95 mmol $\text{HCl} \cdot \text{H-Leu-Glu}(\text{OBu}^t)\text{-OMe}$), das ebenfalls ölig ist, wird mit 21.2 g (95 mmol) Z-Ala-OH und 26.6 g (190 mmol) HOBT in 200 ml DMF gelöst. Bei 0° gibt man 12.2 ml (95 mmol) *N*-Äthylmorpholin und eine eiskalte Lösung von 20.9 g DCC in DMF zu. Man läßt 1 h bei 0° und 1 h bei Raumtemp. stehen, saugt den Niederschlag ab und arbeitet das Filtrat wie in Beispiel 1. auf. Der Rückstand wird zur weiteren Reinigung in Tetrahydrofuran über basisches Al_2O_3 chromatographiert. Das Eluat wird eingengt und mit Petroläther verrichen. Ausb. 40 g (75 %, bezogen auf Z-Leu-OH), Schmp. 96–98°, $[\alpha]_D^{20}$: -54.1° ($c = 2$, in Methanol).

$\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_8$ (535.6) Ber. C 60.54 H 7.72 N 7.84 Gef. C 59.7 H 7.9 N 8.0

6. *Benzoyloxycarbonyl-L-alanyl-L-leucyl-L-glutaminsäure(γ-tert-butylester)* (8): 15.85 g (28.65 mmol) 7 werden in einer Mischung aus 100 ml Dioxan und 16 ml Wasser suspendiert. Unter Rühren läßt man langsam innerhalb von 2–3 h 29 ml 1N NaOH zutropfen (Thymolphthalein als Indikator). Anschließend wird mit 2N Citronensäure neutralisiert und eingengt. Der Rückstand wird zwischen 2N Citronensäure und Essigester verteilt. Die Essigesterlösung wird mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingengt. Der Rückstand kristallisiert aus Essigester/Petroläther. Ausb. 14.05 g (91 %), Schmp. 142–145°. Nach Umkristallisation aus Essigester/Petroläther Schmp. 145–148°, $[\alpha]_D^{20}$: -45° ($c = 2$, in Methanol).

$\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_8$ (521.6) Ber. C 59.87 H 7.53 N 8.06 Gef. C 59.5 H 7.6 N 8.2

⁹⁾ G. F. Holland und L. A. Cohen, J. Amer. chem. Soc. **80**, 3765 (1958).

¹⁰⁾ M. Bergmann und L. Zervas, Ber. dtsch. chem. Ges. **65**, 1192 (1932).

¹¹⁾ E. Klieger und H. Gibian, Liebigs Ann. Chem. **655**, 195 (1962).

7. *Benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-alanyl-L-leucyl-L-glutaminsäure(γ-tert-butylester)* (**9**): 11 g **8** werden in einer Mischung aus 50 ml Methanol und 50 ml Eisessig nach Zugabe von Palladium-Katalysator katalytisch hydriert. Der Katalysator wird nach beendeter Hydrierung abfiltriert, das Filtrat wird eingeeengt und der Rückstand mit Äther verrieben. Ausb. 7.95 g, Schmp. 214–215°. Zur Suspension des Produktes in 50 ml DMF gibt man 7.25 g Z-Leu-OSu¹²⁾ (ca. 20% Überschuß) und rührt 1 Tag bei Raumtemp. Man engt die Lösung ein und verteilt den Rückstand zwischen Essigester und 2N Citronensäure. Die Essigesterphase wird mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Nach Umkristallisieren aus Essigester/Petroläther Ausb. 10.45 g (82%), Schmp. 186–189°, $[\alpha]_D^{22}$: -49.5° ($c = 2$, in Methanol).

C₃₂H₅₀N₄O₉ (634.8) Ber. C 60.55 H 7.94 N 8.83 Gef. C 60.0 H 7.8 N 8.8

¹²⁾ G. W. Anderson, J. E. Zimmerman und F. M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. **86**, 1839 (1964).