

Zur Synthese von Peptiden mit Eigenschaften des Human-Proinsulin-C-Peptids ($_{\text{h}}$ C-Peptid), IV¹⁾

Darstellung der Sequenz 1—8 des Human-Proinsulin-C-Peptids

Georg Jäger

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

Eingegangen am 12. September 1972

Die Synthese von Boc-Glu(OBu^t)-Ala-Glu(OBu^t)-Asp(OBu^t)-Leu-Gln-Val-Gly-OH (*tert*-Butoxycarbonyl-C^Y1-*tert*-butoxy-C^Y3-*tert*-butoxy-C^β4-*tert*-butoxy-Human-Proinsulin-C-Peptid-(1-8)-octapeptid) wird beschrieben.

Notes on the Synthesis of Peptides with the Properties of Human Proinsulin C-Peptide ($_{\text{h}}$ C-Peptide), IV¹⁾

Synthesis of the Sequence 1—8 of Human Proinsulin C-Peptide

The synthesis of Boc-Glu(OBu^t)-Ala-Glu(OBu^t)-Asp(OBu^t)-Leu-Gln-Val-Gly-OH (*tert*-butoxycarbonyl-C^Y1-*tert*-butoxy-C^Y3-*tert*-butoxy-C^β4-*tert*-butoxy-human proinsulin C-peptide-(1-8)-octapeptide) is described.

Der schrittweise Aufbau von Boc-Glu(OBu^t)-Ala-Glu(OBu^t)-Asp(OBu^t)-Leu-Gln-Val-Gly-OH (**15**)²⁾, das der Sequenz 33—40 des Human-Proinsulins entspricht und als Teilstück zur Synthese des Human-Proinsulin-C-Peptids³⁾ diene, ist aus Schema 1 ersichtlich.

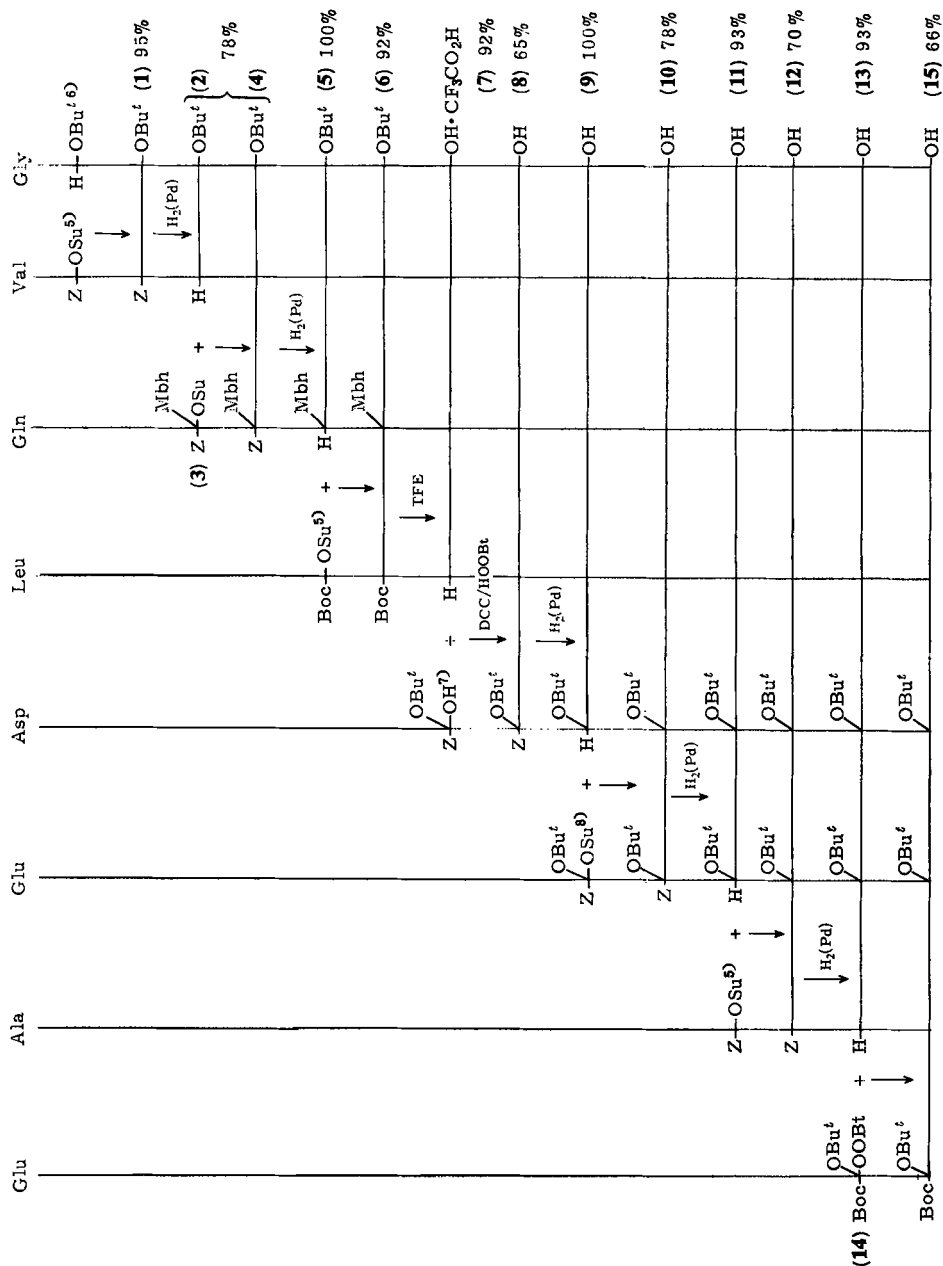
Zunächst wurde das Tripeptid Z-Gln-Val-Gly-OBu^t ohne Schutz der Amidfunktion des Glutamins hergestellt. Die nachfolgende katalytische Hydrierung dieser Verbindung wurde in Essigsäure durchgeführt, da das Peptid selbst in Dimethylacetamid schwer löslich war. Dabei bildete sich jedoch in beträchtlichem Umfang Pyroglutamylpeptid. Durch Verwendung der 4,4'-Dimethoxybenzhydryl-Gruppe⁴⁾ zum Schutz der Amidfunktion konnten wir diese Nebenreaktion vermeiden und erhielten so bei der katalytischen Hydrierung des völlig geschützten Tripeptids **4** in Essigsäure H-Gln(Mbh)-Val-Gly-OBu^t·CH₃CO₂H (**5**) in quantitativer Ausbeute.

¹⁾ III. Mitteil.: R. Geiger und A. Volk, Chem. Ber. **106**, 199 (1973), vorstehend.

²⁾ Abkürzungen entspr. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **348**, 256, 262 (1967). OSu = *N*-Hydroxysuccinimidester, Mbh = 4,4'-Dimethoxybenzhydryl, OObt = 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazinester.

³⁾ R. Geiger, G. Jäger, W. König und G. Treuth, Chem. Ber. **106**, 188 (1973).

⁴⁾ W. König und R. Geiger, Chem. Ber. **103**, 2041 (1970).

Synthese von Boc-Glu(OBu^t)-Ala-Glu(OBu^t)-Asp(OBu^t)-Leu-Gln-Val-Gly-OH (15)

TFE = Trifluoressigsäure; DCC = Dicyclohexylcarbodiimid; HOObt = 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin

- 5) G. W. Anderson, J. E. Zimmerman und F. M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. **86**, 1839 (1964).
 6) G. W. Anderson und F. M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. **82**, 3359 (1960).
 7) R. Schwyzer und H. Dietrich, Helv. chim. Acta **44**, 2003 (1961).
 8) R. Zabel und H. Zahn, Z. Naturforsch. **20b**, 650 (1965).

Das bei der weiteren Umsetzung von **5** mit Boc-Leu-OSu⁵⁾ entstandene geschützte Tetrapeptid **6** lieferte bei 5 min Kochen mit Trifluoressigsäure/Anisol (10:1) glatt das freie Tetrapeptid **7**. Da dieses Tetrapeptid mit aminoendständigem Leucin infolge sterischer Hinderung mit Z-Asp(OBu^t)-OSu⁹⁾ nur sehr langsam reagierte, wurde Z-Asp(OBu^t)-OH^{9,7)} mit 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin/Dicyclohexylcarbodiimid¹⁰⁾ voraktiviert und bei der Umsetzung mit **7** eine beträchtliche Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit erreicht. Zur Herstellung des Octapeptids **15** konnte im letzten Syntheseschritt Boc-Glu(OBu^t)-OH¹¹⁾ in Form des kristallinen 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazinesters **14** eingesetzt werden.

Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden im Apparat nach Dr. Tottoli bestimmt und sind nicht korrigiert. Die spez. Drehwerte wurden im Polarimeter 141 von Perkin-Elmer gemessen. Die Reinheitsprüfung der Substanzen erfolgte dünnschichtchromatographisch in mehreren Systemen. Alle Produkte wurden i. Hochvak. über P₂O₅ getrocknet.

Die Aminosäure-Analyse wurde nach 24stdg. Hydrolyse mit 6 N HCl (bei 120°) mit einem Beckman-Aminosäure-Analysator vorgenommen.

1. *Benzylloxycarbonyl-L-valyl-glycin-tert-butylester* (**1**): 26.23 g (0.20 mol) H-Gly-OBu^t⁶⁾ und 69.64 g (0.20 mol) Z-Val-OSu⁵⁾ werden in 200 ml DMF unter Kühlen gelöst. Nach 4stdg. Stehenlassen bei Raumtemp. wird die Lösung i. Hochvak. eingedampft, der feste Rückstand in Chloroform aufgenommen, die Lösung mit wäbr. Citronensäure, NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. eingedampft. Ausb. 71.18 g (95%). Schmp. 146.5–147.5°; $[\alpha]_D^{25}$: -7.6° ($c \approx 1$, in Chloroform).

C₁₉H₂₈N₂O₅ · 1/2 H₂O (373.5) Ber. C 61.11 H 7.83 N 7.50 Gef. C 60.8 H 7.6 N 7.7

2. *Benzylloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-valyl-glycin-tert-butylester*: 18.22 g (48.8 mmol) Z-Val-Gly-OBu^t · 1/2 H₂O (**1**) werden in 50 ml Dimethylacetamid in Gegenwart von Palladiumschwarz 6 1/2 h hydriert. Dann wird filtriert, der Filtrerrückstand mit 12 ml DMF gewaschen und das Filtrat mit 20.87 g (52 mmol) Z-Gln-ONp¹²⁾ versetzt. Nach dem Verdünnen mit 300 ml DMF rührt man 20 h bei Raumtemp. und gießt anschließend die Suspension in 500 ml Äthylacetat. Den Niederschlag saugt man ab und wäscht mit Äthylacetat. Ausb. 17.06 g (71%). Schmp. 223° (Zers.); $[\alpha]_D^{25}$: $+31.8^\circ$ ($c = 1$, in Eisessig).

C₂₄H₃₆N₄O₇ (492.6) Ber. C 58.52 H 7.37 N 11.38 Gef. C 58.4 H 7.5 N 11.4

Bei der katalytischen Hydrierung vorstehender Verbindung in Eisessig entstand ninhydrinpositives H-Gln-Val-Gly-OBu^t, das aber bereits nach einer Hydrierungsdauer von 2 h beträchtliche Mengen an ninhydrin-negativem Pyroglutamylpeptid enthält; nach Entfernung des Palladium/Bariumsulfat-Katalysators und Eindampfen i. Hochvak. zeigte das Dünnschichtchromatogramm fast ausschließlich nur noch ninhydrin-negative Substanz an.

3. *N^α-Benzylloxycarbonyl-N^γ-(4,4'-dimethoxybenzhydryl)-L-glutamin-[N-hydroxy-succinimidester]* (**3**)¹³⁾: 15.20 g (30 mmol) Z-Gln(Mbh)-OH⁴⁾ und 3.45 g (30 mmol) N-Hydroxy-succinimid werden in 60 ml DMF bei 0° mit 6.6 g (32 mmol) DCC versetzt. Man rührt 2 h bei 0° und 1 h bei Raumtemp., saugt nach Abkühlen vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab, dampft das Filtrat i. Hochvak. ein und kocht den Rückstand dreimal mit Isopropylalkohol aus. Ausb. 14.6 g (81%). Schmp. 197–199°; $[\alpha]_D^{25}$: -16.3° ($c = 1$; in Dimethylacetamid).

⁹⁾ E. Wünsch und A. Zwick, Chem. Ber. **99**, 105 (1966).

¹⁰⁾ W. König und R. Geiger, Chem. Ber. **103**, 2034 (1970).

¹¹⁾ E. Schnabel, Liebigs Ann. Chem. **702**, 188 (1967).

¹²⁾ M. Bodanszky und V. du Vigneaud, J. Amer. chem. Soc. **81**, 5688 (1959).

¹³⁾ Vgl. W. König und R. Geiger, Chem. Ber. **105**, 2872 (1972).

4. *N*^ε-Benzyloxycarbonyl-*N*^γ-(4,4'-dimethoxybenzhydryl)-*L*-glutaminyl-*L*-valyl-glycin-*tert*-butylester (4): 11.20 g (30 mmol) Z-Val-Gly-OBu^t · 1/2 H₂O (1) werden in 50 ml Dimethylacetamid 1 h in Gegenwart von Palladium/Bariumsulfat hydriert. Man saugt vom Katalysator ab, wäscht mit 30 ml DMF und versetzt das Filtrat mit 18.11 g (30 mmol) Z-Gln(Mbh)-OSu (3). Nach dem Verdünnen mit 220 ml DMF rührt man 4 h bei Raumtemp., gießt die Suspension in 350 ml Äthylacetat, saugt den Niederschlag nach 2stdg. Rühren ab und wäscht mit Äthylacetat. Das getrocknete Produkt wird dann in Wasser verrieben, abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Ausb. 16.8 g (78 %). Schmp. 228–230° (Zers.); [α]_D²⁵: –19.4° (*c* = 0.5, in Eisessig).

C₃₉H₅₀N₄O₉ (718.9) Ber. C 65.16 H 7.01 N 7.79 Gef. C 64.8 H 6.9 N 7.9

5. *tert*-Butoxycarbonyl-*L*-leucyl-*N*^γ-(4,4'-dimethoxybenzhydryl)-*L*-glutaminyl-*L*-valyl-glycin-*tert*-butylester (6)

a) 16.17 g (22.5 mmol) Z-Gln(Mbh)-Val-Gly-OBu^t (4) werden in 750 ml Eisessig in Gegenwart von Palladium/Bariumsulfat 2 1/2 h hydriert. Nach Entfernung des Katalysators wird i. Hochvak. eingengt, der Rückstand in Äther verrieben, abgesaugt und i. Hochvak. über KOH und P₂O₅ getrocknet: 14.5 g (100 %) H-Gln(Mbh)-Val-Gly-OBu^t · CH₃CO₂H (5) vom Schmp. 154–155°.

b) 14.5 g (22.5 mmol) H-Gln(Mbh)-Val-Gly-OBu^t · CH₃CO₂H (5) und 7.39 g (22.5 mmol) Boc-Leu-OSu⁵⁾ werden in 250 ml DMF gelöst. Nach der Zugabe von 2.88 ml (22.5 mmol) *N*-Äthylmorpholin bei 0° und 4stdg. Rühren bei Raumtemp. versetzt man die Lösung unter Kühlen mit Wasser und saugt den Niederschlag ab. Ausb. 16.60 g (92 %). Schmp. 222–222.5° (Zers.); [α]_D²⁵: –34.6° (*c* = 1, in Eisessig).

C₄₂H₆₃N₅O₁₀ (798.0) Ber. C 63.22 H 7.96 N 8.78 Gef. C 62.9 H 8.0 N 8.9

6. *Benzyloxycarbonyl-L-aspartyl(β-tert-butylester)-L-leucyl-L-glutaminyl-L-valyl-glycin* (8)

a) 7.98 g (10 mmol) Boc-Leu-Gln(Mbh)-Val-Gly-OBu^t (6) werden in 20 ml Trifluoressigsäure/Anisol (10 : 1) 5 min unter schwachem Rückfluß gekocht. Nach dem Einengen i. Vak. wird der ölige Rückstand mit absol. Äther verrieben, dekantiert, mit Äthylacetat ausgekocht, die farblosen Kristalle abgesaugt und über KOH und P₂O₅ i. Hochvak. getrocknet. Ausb. 4.85 g (92 %) H-Leu-Gln-Val-Gly-OH · CF₃CO₂H (7) vom Schmp. 175–178° (Zers.).

b) 3.23 g (10 mmol) Z-Asp(OBu^t)-OH^{9,7)} und 1.63 g (10 mmol) 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin¹⁴⁾ werden in 40 ml DMF nach Zugabe von 2.06 g (10 mmol) DCC bei 0° 1 h bei 0° und 1 h bei Raumtemp. gerührt. Dann werden 4.76 g (9 mmol) H-Leu-Gln-Val-Gly-OH · CF₃CO₂H (7) und bei 0° 2.30 ml (18 mmol) *N*-Äthylmorpholin zugegeben und der Ansatz nach Verdünnen mit 40 ml DMF 5 h bei Raumtemp. gerührt. Man engt i. Hochvak. ein, verreibt den Rückstand mit NaHCO₃-Lösung, saugt ab, wäscht zunächst mit Wasser, dann mit wäßriger Citronensäure und schließlich mit Wasser. Das getrocknete Rohprodukt wird aus Methanol umkristallisiert. Ausb. 4.38 g (65 %) 8. Schmp. 230–231° (Zers.); [α]_D²⁵: –37.8° (*c* = 1, in Eisessig).

C₃₄H₅₂N₆O₁₁ · 1/2 H₂O (747.8) Ber. C 54.61 H 7.41 N 11.24 Gef. C 54.6 H 7.2 N 11.4

7. *Benzyloxycarbonyl-L-glutamyl(γ-tert-butylester)-L-aspartyl(β-tert-butylester)-L-leucyl-L-glutaminyl-L-valyl-glycin* (10)

a) 4.49 g (6 mmol) Z-Asp(OBu^t)-Leu-Gln-Val-Gly-OH · 1/2 H₂O (8) werden in 500 ml Eisessig in Gegenwart von Palladium/Bariumsulfat 2 h hydriert. Nach Entfernung des Katalysators und Eindampfen i. Hochvak. verreibt man den festen Rückstand in Äther: 3.88 g (100 %) H-Asp(OBu^t)-Leu-Gln-Val-Gly-OH · CH₃CO₂H (9); Zers. bei ca. 225°.

¹⁴⁾ D. Harrison und A. C. B. Smith, J. chem. Soc. [London] 1960, 2157.

b) 3.88 g (6 mmol) H-Asp(OBu^t)-Leu-Gln-Val-Gly-OH · CH₃CO₂H (**9**) und 2.87 g (6.6 mmol) Z-Glu(OBu^t)-OSu⁸⁾ versetzt man in 150 ml DMF bei 0° mit 1.54 ml (12 mmol) *N*-Äthylmorpholin. Nach 18stdg. Rühren bei Raumtemp. dampft man die filtrierte Lösung i. Hochvak. ein. Den Rückstand verreibt man mit wäbr. Citronensäure, saugt die gebildeten Kristalle ab und wäscht mit Wasser. Das getrocknete Rohprodukt wird mit Methanol ausgekocht. Ausb. 4.29 g (78%) **10**. Schmp. 210–211.5° (Zers.); $[\alpha]_D^{25}$: –40.0° (*c* = 1, in Eisessig). C₄₃H₆₇N₇O₁₄ · 1/2 H₂O (915.1) Ber. C 56.44 H 7.49 N 10.72 Gef. C 56.6 H 7.4 N 10.4

8. *Benzyloxycarbonyl-L-alanyl-L-glutamyl(γ-tert-butylester)-L-aspartyl(β-tert-butylester)-L-leucyl-L-glutaminyl-L-valyl-glycin (12)*

a) 4.26 g (4.65 mmol) Z-Glu(OBu^t)-Asp(OBu^t)-Leu-Gln-Val-Gly-OH · 1/2 H₂O (**10**) werden in 175 ml Eisessig in Gegenwart von Palladium/Bariumsulfat wie üblich hydriert. Ausb. 3.6 g (93%) H-Glu(OBu^t)-Asp(OBu^t)-Leu-Gln-Val-Gly-OH · CH₃CO₂H (**11**).

b) 3.58 g (4.3 mmol) H-Glu(OBu^t)-Asp(OBu^t)-Leu-Gln-Val-Gly-OH · CH₃CO₂H (**11**) und 1.52 g (4.75 mmol) Z-Ala-OSu⁵⁾ werden nach Zugabe von 1.10 ml (8.6 mmol) *N*-Äthylmorpholin in 150 ml DMF 18 h bei Raumtemp. gerührt. Nach dem Eindampfen i. Hochvak. verreibt man den Rückstand mit wäbr. Citronensäure, saugt ab, wäscht mit Wasser und kocht nach dem Trocknen mit Methanol aus. Ausb. 3.01 g (70%) **12**. Zers. ab 242°; $[\alpha]_D^{25}$: –46.1° (*c* = 1, in Eisessig).

C₄₆H₇₂N₈O₁₅ · H₂O (995.2) Ber. C 55.51 H 7.49 N 11.26 Gef. C 55.5 H 7.5 N 11.2

9. *tert-Butoxycarbonyl-L-glutamyl(γ-tert-butylester)-L-alanyl-L-glutamyl(γ-tert-butylester)-L-aspartyl(β-tert-butylester)-L-leucyl-L-glutaminyl-L-valyl-glycin (15)*

a) 2.99 g (3 mmol) Z-Ala-Glu(OBu^t)-Asp(OBu^t)-Leu-Gln-Val-Gly-OH · H₂O (**12**) werden in 200 ml 90proz. Essigsäure in Gegenwart von Palladium/Bariumsulfat hydriert; nach Entfernung des Katalysators dampft man i. Hochvak. ein und verreibt den Rückstand mit Äther. Ausb. 2.53 g (93%) H-Ala-Glu(OBu^t)-Asp(OBu^t)-Leu-Gln-Val-Gly-OH · CH₃CO₂H (**13**). Zers. ab 235°.

b) α) *tert-Butoxycarbonyl-L-glutamyl(γ-tert-butylester)-α-(3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazinester) (14)*: Die Lösung von 4.55 g (15 mmol) Boc-Glu(OBu^t)-OH¹¹⁾ und 2.44 g (15 mmol) 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin in 90 ml Tetrahydrofuran versetzt man bei 0° mit 3.09 g (15 mmol) DCC. Nach 1stdg. Rühren bei 0° und 1stdg. Rühren bei Raumtemp. saugt man vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab, dampft das Filtrat i. Vak. ein und kristallisiert den Rückstand aus Isopropylalkohol um. Ausb. 5.6 g (83%). Schmp. 136.5–138°; $[\alpha]_D^{25}$: –79.6° (*c* = 1, in Dioxan).

C₂₁H₂₈N₄O₇ (448.5) Ber. C 56.24 H 6.29 N 12.49 Gef. C 56.5 H 6.2 N 12.6

β) 1.99 g (2.2 mmol) H-Ala-Glu(OBu^t)-Asp(OBu^t)-Leu-Gln-Val-Gly-OH · CH₃CO₂H (**13**) und 1.12 g (2.5 mmol) Boc-Glu(OBu^t)-OOBt (**14**) versetzt man in 100 ml DMF bei 0° mit 0.56 ml (4.4 mmol) *N*-Äthylmorpholin. Nach 4stdg. Rühren bei Raumtemp. dampft man i. Hochvak. ein, verreibt den halbfesten Rückstand mit NaHCO₃-Lösung, saugt ab, verreibt dann mit KHSO₄/K₂SO₄-Lösung¹⁵⁾, saugt erneut ab und wäscht mit Wasser. Das getrocknete Rohprodukt wird zweimal mit je 50 ml Methanol/Wasser (9:1) ausgekocht. Ausb. 1.64 g (66%) **15**. Schmp. 242° (Zers.); $[\alpha]_D^{25}$: –46.1° (*c* = 1, in Eisessig).

C₅₂H₈₉N₉O₁₈ (1128.4) Ber. C 55.35 H 7.95 N 11.17 Gef. C 55.2 H 8.0 N 11.0

Aminosäureanalyse: Ber. Glu 3.0 Ala 1.0 Asp 1.0 Leu 1.0 Val 1.0 Gly 1.0

Gef. Glu 3.13 Ala 0.98 Asp 1.03 Leu 1.04 Val 1.02 Gly 1.00

¹⁵⁾ R. Spangenberg, P. Thamm und E. Wünsch, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **352**, 655 (1971).