

Zur Synthese von Peptiden mit Eigenschaften des Human-Proinsulin-C-Peptids ($_{\text{h}}\text{C}$ -Peptid), VI¹⁾

Darstellung der Gesamtsequenz des Human-Proinsulin-C-Peptids und seines [Glu⁹, Gln¹¹]-Analogen

Rolf Geiger*, Georg Jäger und Wolfgang König

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

Eingegangen am 11. April 1973

Die Darstellung der Gesamtsequenz und die Reinigung des $_{\text{h}}\text{C}$ -Peptids und seines [Glu⁹, Gln¹¹]-Analogen werden beschrieben. Die letztere Verbindung wurde in guter Ausbeute und hoher Reinheit erhalten, während das $_{\text{h}}\text{C}$ -Peptid selbst erst nach elektrophoretischer Reinigung in mäßiger Ausbeute isoliert wurde. Die Bindungskurve der beiden synthetischen Peptide an Meerschweinchen-Antikörper gegen natürliches $_{\text{h}}\text{C}$ -Peptid läuft der des natürlichen C-Peptids parallel.

Notes on the Synthesis of Peptides with the Properties of Human Proinsulin C-Peptide ($_{\text{h}}\text{C}$ -Peptide), VI¹⁾

Synthesis of the Complete Sequence of Human Proinsulin C-Peptide and its [Glu⁹, Gln¹¹]Analogue

Synthesis and purification of $_{\text{h}}\text{C}$ -peptide and its [Glu⁹, Gln¹¹]analogue are described. The latter compound was obtained in a good yield and high purity whereas the $_{\text{h}}\text{C}$ -peptide itself has been isolated in a poor yield only after electrophoretic purification. The binding curve of both synthetic peptides for guinea pig antibodies against natural $_{\text{h}}\text{C}$ -peptide is parallel to those of the natural $_{\text{h}}\text{C}$ -peptide.

In vorangehenden Publikationen beschrieben wir den Synthesepfad und die Herstellung von Teilsequenzen des $_{\text{h}}\text{C}$ -Peptids **1**^{2,3)} und seines [Glu⁹,Gln¹¹]-Analogen **2**^{1,4-8)}.

Die Synthese hatte zunächst die Darstellung von **2** zum Ziel, da dieses Peptid der anfangs aufgestellten Konstitutionsformel entsprach⁹⁾. Eine geringfügige Korrektur dieser Sequenzformel durch den Austausch von Glu und Gln in den Positionen 9 und 11 zwang zur Umstellung der Synthese.

¹⁾ V. Mittel.: R. Geiger, G. Treuth und F. Burow, Chem. Ber. **106**, 2339 (1973), vorstehend.

²⁾ P. E. Oyer, S. Cho, J. D. Peterson und D. F. Steiner, J. Biol. Chem. **246**, 1375 (1971).

³⁾ A. S. C. Ko, D. G. Smyth, J. Markussen und F. Sundby, Europ. J. Biochem. **20**, 190 (1971).

⁴⁾ I. Mittel.: R. Geiger, G. Jäger, W. König und G. Treuth, Chem. Ber. **106**, 188 (1973).

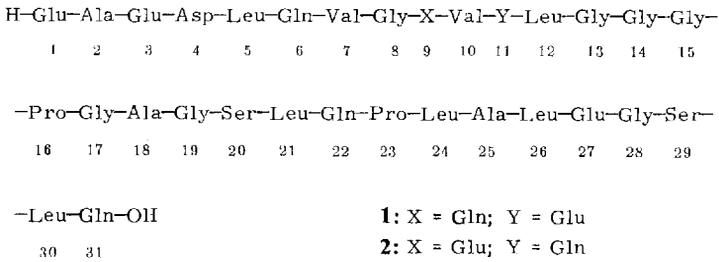
⁵⁾ II. Mittel.: W. König, Chem. Ber. **106**, 193 (1973).

⁶⁾ III. Mittel.: R. Geiger und A. Volk, Chem. Ber. **106**, 199 (1973).

⁷⁾ IV. Mittel.: G. Jäger, Chem. Ber. **106**, 206 (1973).

⁸⁾ Abkürzungen entsprechend 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.

⁹⁾ P. E. Oyer, S. Cho und D. F. Steiner, Federat. Proc. **29**, 533 (1970).



Leider lagen zu diesem Zeitpunkt alle Fragmente bereits vor, und der Aufbau der Gesamtsequenz war so weit fortgeschritten, daß wir uns entschlossen, die Synthese des ursprünglich angestrebten Peptids **2**, das nun als $[\text{Glu}^9, \text{Gln}^{11}]_n\text{C}$ -Peptid bezeichnet werden mußte, fortzusetzen. Daneben wurde zur Synthese des eigentlichen $_n\text{C}$ -Peptides unter Beibehalten der Kondensationsstellen und der bereits synthetisierten Fragmente **3¹⁾** und **5⁷⁾** nur die Sequenz 9–13 geändert und mit neuen Schutzgruppen versehen (**6⁶⁾**. Die genannten Fragmente sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1. Geschützte Peptid-Fragmente zur Synthese des $_n\text{C}$ -Peptids und seines $[\text{Glu}^9, \text{Gln}^{11}]$ -Analogen

H-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-		
-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu(OBu ^t)-Gly-		
-Ser(Bu ^t)-Leu-Gln-OBu ^t · TosOH · H ₂ O	(14-31)	3¹⁾
Z-Glu(OBu ^t)-Val-Gln-Leu-Gly-OH	(9-13) _a	4⁶⁾
Boc-Glu(OBu ^t)-Ala-Glu(OBu ^t)-		
-Asp(OBu ^t)-Leu-Gln-Val-Gly-OH	(1-8)	5⁷⁾
Nps-Gln(Mbh)-Val-Glu(OBu ^t)-Leu-Gly-OH	(9-13) _b	6⁶⁾
H-Glu(OBu ^t)-Val-Gln-Leu-Gly-Gly-Gly-		
-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-		
-Ala-Leu-Glu(OBu ^t)-Gly-Ser(Bu ^t)-Leu-		
-Gln-OBu ^t · TosOH · H ₂ O	(9-31) _a	7¹⁾
H-Gln(Mbh)-Val-Glu(OBu ^t)-Leu-Gly-Gly-		
-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-		
-Leu-Ala-Leu-Glu(OBu ^t)-Gly-Ser(Bu ^t)-		
-Leu-Gln-OBu ^t · H ₂ O	(9-31) _b	8¹⁾

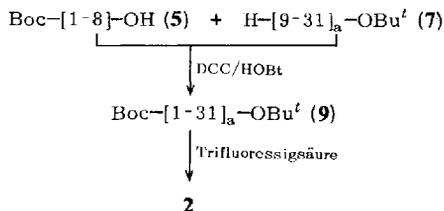
Diese Änderungen waren notwendig geworden, weil als Folge des neuen Strukturvorschlags Glutamin an das Aminoende des Fragments 9–13 gerückt war.

Um während der Kondensation Cyclisierung von Glutamin zu Pyroglutaminsäure zu vermeiden, wurde die γ -Amidgruppe durch den Mhb-Rest¹⁰⁾ geschützt.

Obwohl einer reversiblen Blockierung der α -Aminogruppe des Glutamins durch den Benzyloxycarbonyl-Rest grundsätzlich nichts im Wege gestanden hätte, da der 4,4'-Dimethoxybenzhydryl-Rest durch katalytische Hydrierung nicht abgespalten wird, wollten wir das Risiko nicht eingehen, das in einer möglichen sterischen Behinderung der Abspaltung der Benzyloxycarbonyl-Gruppe lag. So verwendeten wir an dieser Stelle den *o*-Nitrophenylsulfenyl-Rest¹¹⁾, dessen Abspaltung nach *Wünsch* und *Spangenberg*¹²⁾ mittels Ammoniumrhodanid in Anwesenheit von 2-Methylindol keine Komplikationen erwarten ließ. Wie sich aber im Verlauf der Synthese herausstellte, führte gerade die Verwendung der Nps-Gruppe zu neuen Schwierigkeiten, die auf der Instabilität dieser Schutzgruppe gegenüber 1-Hydroxybenzotriazol beruhen¹⁾.

Zunächst wurde die Synthese des [Glu⁹,Gln¹¹]_hC-Peptids **2** weitergeführt (Schema 1).

Schema 1. Synthese von [Glu⁹, Gln¹¹]_hC-Peptid



Die Kondensation von **5** mit **7** nach der DCC/HOBT-Methode¹³⁾ verlief so glatt und spezifisch, daß im rohen Reaktionsprodukt neben neugebildetem **9** nur wenig des in geringem Überschuß eingesetzten **5** zu erkennen war; **7** war nicht mehr vorhanden.

In einem Vorversuch wurden die Schutzgruppen durch einstündiges Stehenlassen in Trifluoressigsäure abgespalten. Das entstandene Peptid **2** erwies sich als wenig löslich in Wasser und damit leicht zu reinigen. Papierelektrophorese bei pH 2 ergab dasselbe Bild wie die Dünnschichtchromatographie der geschützten Verbindung: Neben **2** war im Rohprodukt nur wenig Octapeptid (1–8), dagegen kein Tricosipeptid (9–31)_a zu sehen. Der in Wasser nicht gelöste Anteil war reines **2**, während sich das Octapeptid (1–8) im Filtrat fand.

Aufgrund dieser Beobachtung wurde auf die Reinigung des noch geschützten Hentriakontapeptids **9** verzichtet. Die Abspaltung der Schutzgruppen und Isolierung

¹⁰⁾ W. König und R. Geiger, Chem. Ber. **103**, 2041 (1970).

¹¹⁾ L. Zervas, D. Borovas und E. Gazis, J. Amer. Chem. Soc. **85**, 3660 (1963).

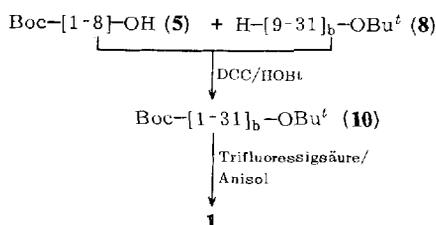
¹²⁾ E. Wünsch und R. Spangenberg, Chem. Ber. **105**, 740 (1972).

¹³⁾ W. König und R. Geiger, Chem. Ber. **103**, 788 (1970).

wurden wie oben beschrieben vorgenommen. Dabei konnte das rohe Peptid **2** durch Verrühren mit wenig Wasser und Abstumpfen des pH-Wertes mit etwas Pyridin auf 2.6 in reiner Form erhalten werden.

Weit schwieriger und weniger erfolgreich gestaltete sich die Darstellung des n C-Peptids **1**. Die ersten Komplikationen hatten sich schon bei der Synthese von **8** ergeben¹⁾. Dort war schließlich durch chromatographische Reinigung des Fragments **8** ein Produkt erhalten worden, das für den letzten Kondensationsschritt mit **5** analog der Kondensation **5** + **7** eingesetzt werden konnte (Schema 2).

Schema 2. Synthese des n C-Peptids



Hier gelang es aber auch unter Verwendung eines Überschusses an **5** nicht, die völlige Umsetzung mit **8** zu erreichen. Auch die Anwendung von DCC im Überschuß verbesserte die Qualität des rohen Kondensationsproduktes nicht, sondern führte eher zu einer Verschlechterung.

So wurde ein Rohprodukt erhalten, das noch beträchtliche Mengen **5** und **8** enthielt. Versuche, aus diesem Gemisch die Ausgangsprodukte zu extrahieren, schlugen fehl; nur **5** war unter Verlusten durch Auskochen mit Methanol teilweise zu entfernen, während **8** auf diese Weise nicht vom Reaktionsprodukt abgetrennt werden konnte.

Wir spalteten deshalb ohne weitere Reinigung von **10** die Schutzgruppen durch kurzes Kochen mit Trifluoressigsäure/Anisol ab. Beim versuchsweisen Verrühren mit Wasser ließ sich das Octapeptid (1-8) nahezu völlig, das Tricosipeptid (9-31)_b aber nur teilweise entfernen.

Parallel hierzu wurde ein Versuch unternommen, die Reinigung durch präparative Gelelektrophorese zu bewerkstelligen, da die Papierelektrophorese bei pH 2 gezeigt hatte, daß sich **1** und **2** leicht von Begleitpeptiden abtrennen lassen. Einzelheiten dieses Versuchs sind im experimentellen Teil beschrieben. Die flüssige Phase des Gel-Betts bestand bei diesem Experiment aus 2 N Essigsäure, während das Rohprodukt wegen seiner Schwerlöslichkeit in 75proz. Essigsäure aufgetragen werden mußte. Es blieb bei der Elektrophorese teilweise am Start liegen bzw. bewegte sich nur eine kurze Strecke, jedoch wanderten die Verunreinigungen größtenteils aus. Nach 18stündiger Elektrophorese bei 300 Volt und 0.4 Ampère unter Kühlung wurde ein Abklatsch angefertigt, der nach Anfärben mit Ninhydrin die peptidhaltigen Zonen anzeigte. Die Startzone wurde ausgehoben und das Gel mit 50proz. Essigsäure extrahiert.

Dieser Versuch zur Reinigung war sehr verlustreich, denn aus der n C-Peptid enthaltenden Zone konnten, ausgehend von 250 mg rohem **1**, nur 88 mg **1** isoliert

werden, und selbst dieses Material enthielt nur 40–45% Peptid, wie die quantitative Aminosäureanalyse anzeigte. Der Rest bestand hauptsächlich aus teilweise abgebautem Sephadex, das den sauren Bedingungen nicht allzu lange standhält.

Bei der papierelektrophoretischen Prüfung erwies sich das ${}_h\text{C}$ -Peptid aber immerhin als nahezu rein, frei von Octapeptid (1–8) und nur noch mit sehr wenig Peptid verunreinigt, das sich wie Tricosipeptid (9–31) verhielt.

Durch Verrühren mit wenig 1 N Essigsäure bei 0°C wurde abgebautes Sephadex extrahiert, während das schwerer lösliche ${}_h\text{C}$ -Peptid (1) abzentrifugiert wurde. Die erneute papierelektrophoretische Prüfung ließ nur noch sehr wenig Verunreinigung erkennen. Die Aminosäureanalyse entsprach der erwarteten Zusammensetzung, kam den theoretischen Werten allerdings nicht ganz so nahe wie die des [Glu⁹,Gln¹¹]- ${}_h\text{C}$ -Peptids.

Das ${}_h\text{C}$ -Peptid und sein [Glu⁹,Gln¹¹]-Analogon waren unter den bisher angewandten chromatographischen und elektrophoretischen Methoden nicht voneinander zu unterscheiden, auch ihre optische Rotation ist im Rahmen der Fehlergrenze gleich, und ihr immunologisches Verhalten ist qualitativ dasselbe. Die Forderung nach Parallelität der Bindungskurve der beiden synthetischen Peptide und des natürlichen ${}_h\text{C}$ -Peptids an Meerschweinchen-Antikörper gegen ${}_h\text{C}$ -Peptid ist erfüllt¹⁴⁾.

Wir danken Frau G. Treuth und Herrn D. Langner für experimentelle Unterstützung.

Experimenteller Teil

Drehwerte wurden im lichtelektrischen Polarimeter, Mod. 141 der Fa. Perkin Elmer, gemessen. Die Aminosäureanalysen wurden nach 48 stdg. Hydrolyse mit 6 N HCl bei 110°C mit einem Beckman-Aminosäure-Analysator ermittelt.

Abkürzungen:

Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl	Z	Benzyloxycarbonyl
Bu ^t	<i>tert</i> -Butyl	DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
OBu ^t	<i>tert</i> -Butylester	DMF	Dimethylformamid
Mbh	4,4'-Dimethoxybenzhydryl	HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
Nps	<i>o</i> -Nitrophenylsulfenyl	TosOH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure

1. 1-Glutamyl-1-alanyl-1-glutamyl-L-asparagyl-L-leucyl-L-glutaminyll-L-valyl-glycyl-1-glutamyl-1-valyl-L-glutaminyll-L-leucyl-glycyl-glycyl-glycyl-L-prolyl-glycyl-1-alanyl-glycyl-1-seryl-L-leucyl-1-glutaminyll-L-prolyl-L-leucyl-L-alanyl-L-leucyl-L-glutamyl-glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-glutamin (*i* Glu⁹,Gln¹¹ ${}_h\text{C}$ -Peptid) (2): 650 mg (0.25 mmol) ⁷⁾ und 310 mg (0.275 mmol) ⁵⁾ werden zusammen mit 67.5 mg (0.5 mmol) HOBt in 10 ml DMF gelöst. Man gibt 0.032 ml (0.25 mmol) *N*-Äthylmorpholin und 110 mg (0.5 mmol) DCC zu, rührt 3 h bei Raumtemp., fügt nochmals 0.032 ml (0.25 mmol) *N*-Äthylmorpholin und 52 mg (0.25 mmol) DCC zu, rührt weitere 16 h bei Raumtemp. und fällt mit 60 ml Äther/Petroläther (1:1) 980 mg rohes Reaktionsprodukt aus. DC: in System B neben einer Spur Octapeptid (R_F 0.79) ist das geschützte Hentriacontapeptid als einheitlicher Fleck (R_F 0.59) zu erkennen. Tricosipeptid (R_F 0.37) ist nicht mehr vorhanden. Zur weiteren Charakterisierung wurde eine kleine Probe der Verbindung 1 h bei Raumtemp. mit Trifluoressigsäure behandelt. Der mit Äther ausge-

14) D. F. Steiner und A. H. Rubenstein, persönl. Mitteilung.

fällte Niederschlag wurde einer Papierelektrophorese bei pH 2 (500 ml Essigsäure, 100 ml Ameisensäure, 2000 ml Wasser) unter 400 V Spannung unterworfen. Anfärben mit Ninhydrin und Chlor/Tolidin.

Auch hier war im Reaktionsprodukt nur eine Spur Octapeptid zu erkennen. Wanderungsstrecken nach 4¹/₂ h:

[Glu ⁹ ,Gln ¹¹] _h C-Peptid	5.3 cm
[Glu ⁹ ,Gln ¹¹] _h C-Peptid-(9-31)-trikosipeptid	6.0 cm
_h C-Peptid-(1-8)-octapeptid	6.9 cm

Zur Isolierung der reinen Verbindung wurden 500 mg des rohen, geschützten Hentriakontapeptids **9** in 3 ml Trifluoressigsäure gelöst. Nach 1 h Stehenlassen bei 20°C wurden mit 20 ml Äther 464 mg der freien Verbindung ausgefällt. Der Niederschlag wurde in wenig Wasser suspendiert, pH mit Pyridin auf 2.6 eingestellt. Nach 10 min Rühren bei 0°C wurde abfiltriert und mit wenig Eiswasser gewaschen. Ausb. nach Trocknen über P₂O₅ 378 mg, d. s. 47.6%, bez. auf ursprünglich eingesetztes geschütztes Tricosipeptid. Nach Einengen der Lösung auf 1/3 erhielt man weitere 145 mg (18.3%, zusammen 66%) **2**. $[\alpha]_{D}^{25} = -96.2 \pm 2^\circ$ ($c = 0.5$, in 0.1 N Ammoniak).

C₁₂₉H₂₁₁N₃₅O₄₈ · 8 H₂O (3164.3) Ber. C 48.94 H 7.14 N 15.49 Gef. C 49.0 H 7.1 N 15.4

Aminosäureanalyse: Asp 0.93 (1), Ser 1.77 (2), Glu 7.85 (8), Pro 1.92 (2), Gly 7.00 (7), Ala 3.05 (3), Val 2.08 (2), Leu 6.13 (6).

2. *L*-Glutamyl-*L*-alanyl-*L*-glutamyl-*L*-asparagyl-*L*-leucyl-*L*-glutaminy-*L*-valyl-glycyl-*L*-glutaminy-*L*-valyl-*L*-glutamyl-*L*-leucyl-glycyl-glycyl-glycyl-*L*-prolyl-glycyl-*L*-alanyl-glycyl-*L*-seryl-*L*-leucyl-*L*-glutaminy-*L*-prolyl-*L*-leucyl-*L*-alanyl-*L*-leucyl-*L*-glutamyl-glycyl-*L*-seryl-*L*-leucyl-*L*-glutamin (_hC-Peptid) (**1**): 400 mg (0.15 mmol) **8**, 220 mg (0.195 mmol) **5** und 40 mg (0.3 mmol) HOBT werden in 10 ml DMF gelöst. Man gibt 82 mg (0.4 mmol) DCC zu, rührt 3 h bei Raumtemp., versetzt mit 0.026 ml (0.2 mmol) *N*-Äthylmorpholin sowie 41 mg (0.2 mmol) DCC und rührt weitere 16 h bei Raumtemp. Dann werden mit 80 ml Äther/Petroläther (1:1) 531 mg Rohprodukt ausgefällt.

Zur Abspaltung der Schutzgruppen kocht man das Rohprodukt 10 min in 2.5 ml Trifluoressigsäure/Anisol (9:1) unter Rückfluß und fällt mit 20 ml Äther 412 mg rohes **1** aus.

Papierelektrophorese analog Beispiel 1 zeigte eine beträchtliche Verunreinigung des Reaktionsprodukts **1** durch Octapeptid (1-8) und Tricosipeptid (9-31) an.

Zur Reinigung wurden 250 mg rohes **1**, gelöst in 2 ml 75proz. Essigsäure, auf eine Länge von 30 cm in ein Gel-Bett 45 × 75 cm (Höhe 1 cm) eingetragen. Als Träger wurde Sephadex G-75, superfine[®], in 2 N Essigsäure verwendet. Elektrophorese 18 h bei 300 Volt und 0.4 Ampère. Dann wurde durch Auflegen von Papier 2043 b (Fa. Schleicher & Schüll) ein Abklatsch hergestellt und das Gel im Bereich der Startlinie ausgehoben. Nach Extraktion mit 50proz. Essigsäure, Abschleudern des Gels und Abdestillieren des Lösungsmittels bei 1 Torr wurde ein Rückstand erhalten, der in 0.1 N Ammoniak gelöst und gefriergetrocknet wurde. Ausb. 88 mg **1**, aus den anderen Fraktionen wurden auf dieselbe Weise 98 mg erhalten.

Da eine quantitat. Aminosäureanalyse nur einen Peptidgehalt von 40–45% anzeigte, wurde zweimal mit je 0.4 ml 1 N Essigsäure verrührt und **1** durch Abzentrifugieren isoliert. Ausb. nach Trocknen über P₂O₅ und KOH 21 mg.

Papierelektrophorese (pH 2): Nahezu einheitlich, kein Octapeptid, Spur einer Begleitsubstanz in Höhe des Tricosipeptids. Wanderungsstrecke 5.2 cm (Bedingungen analog Beispiel 1). $[\alpha]_{D}^{25} = -92 \pm 3^\circ$ ($c = 0.3$, in 0.1 N Ammoniak).

Aminosäureanalyse: Asp 0.83 (1), Ser 1.58 (2), Glu 8.04 (8), Pro 1.72 (2), Gly 7.00 (7), Ala 2.73 (3), Val 2.36 (2), Leu 5.88 (6).