

# SYNTHESE EINES GESCHÜTZTEN HEXAPEPTIDES AUS DER INSULINSEQUENZ B 9-14

G. LOSSE und K.-J. SCHUMACHER

Sektion Chemie der Technischen Universität Dresden, DDR

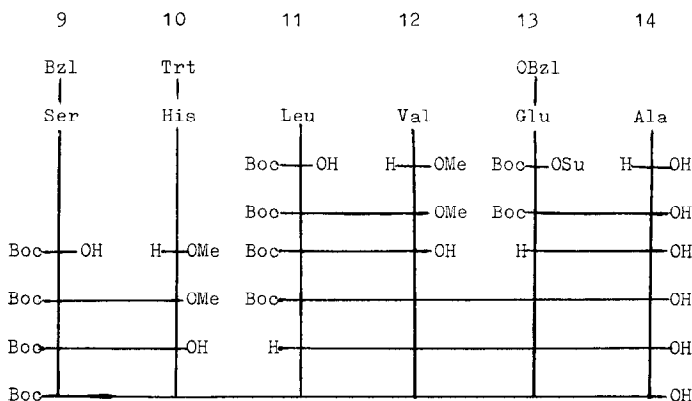
(Received in Germany 30 September 1976; Received in the UK for publication 24 January 1977)

**Zusammenfassung**—Es wird die Synthese des kondensationsfähigen und an den Seitengruppen voll geschützten Insulin B 9-14-Teilstückes Boc-Ser(Bzl)-His(Trt)-Leu-Val-Glu(OBzl)-Ala-OH<sup>+</sup> nach dem Aufbauprinzip 2+2+2 beschrieben.

**Abstract**—The synthesis of the fully sidechain protected insulin B 9–14 partial sequence Boc-Ser(Bzl)-His(Trt)-Leu-Val-Glu(OBzl)-Ala-OH which can be used for fragment condensation including the pathway 2 + 2 + 2 is described.

Auf der Suche nach vorteilhafteren Aufbaumöglichkeiten für die beiden Insulinketten sind auch für das geschützte Teilstück B 9-14 verschiedene Synthesewege bei Anwendung unterschiedlicher Schutzgruppenkombinationen erprobt worden.<sup>1</sup> Neuere Untersuchungen zu diesem Sequenzbereich A - Ser(B) - His(C) - Leu - Val - Glu(D) - Ala - E wurden von Titov und Mitarbeiter<sup>2</sup> (A = Z, B = t-But, C = H, D = Ot-But, E = N<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Boc) sowie von Schwartz und Katsoyannis<sup>3</sup> (A = Boc, B = Bzl, C = Tos, D = OBzl, E = OH) publiziert.

abspalten lässt. Sie ist stabil gegen Alkali und Nucleophile und erlaubt deshalb Verseifungsschritte sowie Azidkupplungen in bestimmten Syntheseabschnitten. Auch ist die N<sup>im</sup>-Tritylgruppe nach früheren Ergebnissen von uns unter den Deblockierungsbedingungen N<sup>o</sup>-ständiger Boc-Gruppen beständig<sup>5</sup> und lässt sich quantitativ durch 1–2 stündige Einwirkung von wasserfreier Ameisen- oder Trifluoressigsäure bei 20° wieder abtrennen.<sup>6–8</sup> Schliesslich erhöhen Tritylreste erheblich die Löslichkeit der Fragmente in organischen Solventien.



In dieser Arbeit wird der Aufbau des Fragmentes als N<sup>α</sup>-Boc-Hexapeptid-Säure mit den acidolytisch abspaltbaren Benzylgruppen an Serin und Glutaminsäure beschrieben (Schema). Um grössere Disponibilität für spätere Syntheseschritte zu gewinnen, wurde auch die N<sup>im</sup>-Funktion des Histidins blockiert, welche nach neueren Erkenntnissen bei Kupplungsreaktionen, an denen DCC beteiligt ist, Nebenreaktionen liefern kann.<sup>4</sup> Unter den heute verfügbaren N<sup>im</sup>-Schutzgruppen wählten wir die Tritylgruppe, die eine hinreichende Stabilität während des gesamten Syntheseablaufes bietet und die sich auch in Gegenwart von Cys-Schwefel schonend

Das Dipeptidderivat 13-14 H-Glu(OBzl)-Ala-OH (Schema) wurde durch DCC-Kupplung von Boc-Glutaminsäure- $\gamma$ -benzylester mit Alanin-*tert.*butylester in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  oder besser durch Umsatz von Boc - Glutaminsäure -  $\alpha$  - N - hydroxysuccinimid -  $\gamma$  - benzylester mit Alanin in Dioxan/Wasser sowie nachfolgender Deblockierung mit TFE/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1) gewonnen. Die Weiterverlängerung zum Glu -  $\gamma$  - geschützten Tetrapeptid 11-14 erfolgte ausgehend von  $\text{N}^\alpha$  - Boc - Leu - Val - OMe, dessen anschliessender Verseifung und DCC/HOBt-Kupplung<sup>9</sup> sowie erneuter Deblockierung der  $\text{N}^\alpha$ -Funktion.

Analog führten wir die Ankondensation des Teilstückes 9–10 aus. Hierzu wurde Histidinmethylester nach Zervas und Mitarbb.<sup>10</sup> über das N<sup>α</sup>, N<sup>im</sup>-Ditrityl-Derivat in N<sup>im</sup>-Trityl-histidinmethylester übergeführt und unter Verwendung von DCC in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> mit N<sup>α</sup> - Boc - O - Benzylserin gekuppelt. Verseifung zu Boc - Ser(Bzl) - His(Trt) - OH und DCC/HOBT-Kupplung<sup>9</sup> mit dem

† Abkürzungen nach den Regeln der IUPAC-IUB-Commission on Biochem. Nomenclature. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **348**, 256 (1967); *J. Biol. Chem.* **247**, 977 (1972). Darüberhinaus gelten folgende Abkürzungen: TFE = Trifluoressigsäure; DCC = Dicyclohexylcarbodiimid; HOBT = N-Hydroxybenzotriazol; HOSu = N-Hydroxysuccinimid; DCHA = Dicyclohexylamin.

Tetrapeptidderivat 11–14 führte zum Hexapeptidderivat Boc-Ser(Bzl)-His(Trt)-Leu-Val-Glu(OBzl)-Ala-OH, das sich gut über das DCHA-Salz reinigen liess. Die Azidmethode versagte in diesem Kondensationsschritt ähnlich wie an der Schnittstelle B 5/6<sup>5</sup> wegen sterischer Hinderung am C-terminalen N<sup>tr</sup>-Tritylhistidin.

#### EXPERIMENTELLER TEIL

Die  $[\alpha]_D$ -Werte wurden mit einer Genauigkeit von  $\pm 0.05^\circ$ , die  $[\alpha]_{546}$ - und  $[\alpha]_{578}$ -Werte mit einer Genauigkeit von  $\pm 0.01^\circ$  bestimmt. Die Dünnschichtchromatographie erfolgte auf Kieselgel G der Fa. Merck (K) sowie auf Silufol (Kavalier-CSSR) (S). Als Laufmittelsysteme wurden verwendet: \*Aceton: Benzol (50:80); <sup>n</sup>-Butanol: Essig: Wasser (4:1:1); <sup>n</sup>-Butanol: Essig: Wasser (10:1:3); <sup>4</sup>Tetra: <sup>n</sup>-Butanol: Essig (85:10:5); \*Äthanol: Wasser: Essig: Benzol (8:4:1:2); <sup>n</sup>-Butanol: Essig: Wasser: Pyridin (30:6:24:20); \*Aceton: Benzol (4:1).

#### 1. Boc-Glu(OBzl)-Ala-OH

Zu einer Suspension von 9.8 g (110 mmol) L-Alanin und 18.48 g (220 mmol) NaHCO<sub>3</sub> in 350 ml Wasser und 100 ml Dioxan werden 43.4 g (100 mmol) Boc-Glu(OBzl)-OSu ( $[\alpha]_D = -20.0^\circ$ ,  $c = 2.0$  in Dioxan), Schmp. 102–104°C in 150 ml Dioxan addiert und 4 Tage bei 20°C gerührt. Die auf 200 ml eingeeengte wässrige Phase füllt man mit Wasser auf 500 ml auf, extrahiert mit Essigester, säuert die wässrige Phase mit 5%-iger KHSO<sub>4</sub>-Lösung unter Kühlen auf pH 3 an und extrahiert wieder mit Essigester. Die vereinigten Extrakte werden mit Citronensäurelösung (pH 3) und Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und bei 10 Torr eingeeengt, wobei das chromatographisch reine Dipeptidderivat auskristallisiert. Ausbeute: 31.8 g (77.7% d. Th.) Schmp. 137–139°C;  $[\alpha]_D = -25.0^\circ$  ( $c = 1.0$  in Methanol);  $R_f = 0.43$  (Ka),  $R_f = 0.92$  (Kb); (Gef. C, 58.52; H, 6.60; N, 6.60. C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (408.44) erfordert C, 58.81; H, 6.71; N, 6.87%). Zur N-Deblockierung wird das Boc-Dipeptid 30 Min. bei 20°C mit 4 n HCl/Dioxan behandelt und nach Einengen mit abs. Äther gefällt.  $R_f = 0.59$  (Sb).

#### 2. Boc-Leu-Val-OH

9.24 g (40 mmol) Boc-Leu-OH (Schmp. 76–77°C)<sup>11</sup> und 6.68 g (40 mmol) HCl×Val-OMe (Schmp. 167°C)<sup>12</sup> werden in 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> bei –10°C aufgenommen, mit 4.4 ml (40 mmol) N-Methylmorpholin versetzt und 20 min. bei –10°C gerührt. Anschließend gibt man 9.04 g (44 mmol) DCC in 15 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> zu, rührt 3–4 h bei –10°C und 4 h bei 0°C, lässt über Nacht bei Raumtemp. stehen, filtriert den Dicyclohexylharnstoff ab und engt die Lösung bei 15 Torr ein. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen, 8× mit Citronensäurelösung (pH 3), 8× mit Bicarbonatlösung (pH 8) und mit Wasser gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und über eine Säule (3×50 cm), die jeweils eine 25 cm Schicht von saurem und basischem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> enthielt, filtriert. Das nach dem Umkristallisieren mit 10.75 g (74.5% d. Th.) Ausbeute resultierende Produkt ist chromatographisch rein. Schmp. 144–145°C; (142–144°C)<sup>13</sup>;  $[\alpha]_D = -40.1^\circ$  ( $c = 1.0$  in Methanol)  $[\alpha]_D = -41.1^\circ$  ( $c = 0.527$  in Methanol)<sup>14</sup>;  $R_f = 0.66$  (Ka)  $R_f = 0.93$  (Sc)  $R_f = 0.52$  (Sd); (Gef. C, 59.40; H, 9.50; N, 8.11; C<sub>17</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (344.44) erfordert C, 59.28; H, 9.37; N, 8.13%). Die Verseifung des Boc-Dipeptid-methylesters wird nach der Vorschrift von B. Kamber<sup>15</sup> durchgeführt. Ausbeute: 3.0 g (91% d. Th.), Schmp. 108–110°C; (109–111°C)<sup>13</sup>  $[\alpha]_D = -31.2^\circ$  ( $c = 2.0$  in Methanol)  $[\alpha]_D = -32^\circ$  ( $c = 2.0$  in Methanol)<sup>13</sup>;  $R_f = 0.49$  (Sa); (Gef. C, 58.10; H, 9.05; N, 8.45. C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (330.4) erfordert C, 58.16; H, 9.15; N, 8.48%).

#### 3. Boc-Leu-Val-Glu(OBzl)-Ala-OH

Die Lösung von 1.21 g (3.7 mmol) Boc-Leu-Val-OH und 0.49 g (3.7 mmol) HOBt in 9 ml DMF wird bei 0°C mit 0.76 g (3.7 mmol) DCC versetzt und 4 h bei 0°C gelassen. Dann filtriert man vom Dicyclohexylharnstoff ab, gibt eine Lösung von 3.3 mmol (0.93 g) HCl×Glu(OBzl)-Ala-OH in 10 ml DMF und 3.3 ml N-Methyl-

morpholin zu. Nach 24-stündigem Rühren bei 20°C wird das DMF bei 1 Torr entfernt, der Rückstand in 200 ml Essigester gelöst, mit Citronensäurelösung (pH 3) extrahiert, mit Wasser gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Die filtrierte Essigesterlösung wird bei 10 Torr auf 30 ml eingeeengt und der Vorgang nach Hinzufügen von jeweils 150 ml Essigester mehrmals wiederholt, wobei das Tetrapeptidderivat in farbloser, chromatographisch einheitlicher Form anfällt. Es wird abgesaugt, mit Petroläther gewaschen, *i* Vak. bei 20 Torr über CaCl<sub>2</sub> getrocknet und aus Essigester und Hexan umkristallisiert. Ausbeute: 0.84 g (41% d. Th.); Schmp. 161–163°C;  $[\alpha]_D = -48.5^\circ$  ( $c = 1.0$  in Methanol)  $[\alpha]_{546} = -59.0^\circ$  ( $c = 1.0$  in Methanol)  $[\alpha]_{578} = -51.0^\circ$  ( $c = 1.0$  in Methanol);  $R_f = 0.32$  (Ka);  $R_f = 0.90$  (Kb);  $R_f = 0.94$  (Ke);  $R_f = 0.64$  (Kf); (Gef. C, 60.04; H, 7.98; N, 9.06; C<sub>31</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub> (620.73) erfordert C, 59.98; H, 7.79; N, 9.03%); Aminosäureanalyse: Leu (1.00); Val (0.90); Glu (1.03); Ala (0.94). Zur N<sup>tr</sup>-Deblockierung wird 30 Min. bei 20°C mit 4 n HCl/Dioxan behandelt.

#### 4. Boc-Ser(Bzl)-His(Trt)-OH

1.48 g (5 mmol) Boc-Ser(Bzl)-OH (Schmp. 55–56°C)<sup>15</sup> und 2.23 g (5 mmol) N<sup>tr</sup>-Trt-His-OMe×HCl (Schmp. 140°C)<sup>10,16</sup> werden bei –10°C in 15 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst, mit 0.6 ml (5 mmol) N-Methylmorpholin versetzt, 15 Min. gerührt und 1.13 g (5.5 mmol) DCC in 2.5 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> zugegeben. Dann wird 2 h bei –10°C, 3 h bei 0°C und 8 h bei 20°C gerührt, der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und die anfallende Lösung bei 15 Torr eingeeengt. Den resultierenden Sirup nimmt man in 100 ml Acetonitril auf, filtriert von Dicyclohexylharnstoff-Resten ab, entfernt das Lösungsmittel bei 15 Torr, nimmt den Rückstand in 200 ml Essigester auf, extrahiert in der Kälte mit Citronensäurelösung und Bicarbonatlösung, wäscht mit Wasser und trocknet die Essigesterphase über MgSO<sub>4</sub>. Ausbeute: 3.5 g (95% d. Th.);  $[\alpha]_D = +1.78^\circ$  ( $c = 1.0$  in Methanol);  $R_f = 0.6$  (Ka)  $R_f = 0.73$  (Kb); Pauly-negativ. Die Verseifung des Boc-Dipeptid-methylesters erfolgt analog der Verseifung von Boc-Leu-Val-OMe nach B. Kamber.<sup>13</sup>  $R_f = 0.61$  (Kb).

#### 5. Boc-Ser(Bzl)-His(Trt)-Leu-Val-Glu(OBzl)-Ala-OH (B 9–14)

1.35 g (2 mmol) Boc-Ser(Bzl)-His(Trt)-OH und 0.29 g (2 mmol) HOBt werden in 6 ml DMF gelöst, bei –25°C unter Rühren mit 412 mg (2 mmol) vorgekühlter DCC-Lösung in 2 ml DMF versetzt und 3 h bis zum Ansteigen der Temperatur auf 0°C gerührt. Dann kühlt man auf –25°C, gibt 780 mg (1.5 mmol) HCl×Leu-Val-Glu(OBzl)-Ala-OH und 3.4 ml (3.0 mmol) N-Methylmorpholin in 4.5 ml DMF hinzu, rührt den Ansatz 2 h bei –25°C, dann noch 24 h bei 20°C ansteigender Temperatur. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird abgesaugt, das DMF bei 1 Torr abdestilliert, der resultierende Sirup in 200 ml Essigester aufgenommen, mit KHSO<sub>4</sub>-Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet, die auf 30 ml konzentrierte Essigesterlösung mit abs. Äther bis zur Trübung versetzt, der nach ca. 2 h ausgefallene Niederschlag abgesaugt, mit Äther gewaschen und bei 20 Torr getrocknet. Zur Entfernung der Ausgangsstoffe wird mit Methanol ausgewaschen, in Chloroform/Methanol gelöst und nach Zugabe der äquivalenten Menge Dicyclohexylamin als DCHA-Salz gefällt, Schmp. 240°C—Freie Carboxylkomponente: Reinausbeute 0.80 g (43% d. Th.), Zers.-Pkt. 170–172°C;  $[\alpha]_D = -35.7^\circ$  ( $c = 1.0$  in DMF);  $R_f = 0.94$  (Sb)  $R_f = 0.74$  (Sf)  $R_f = 0.65$  (Sg); (Gef. N, 9.35; C<sub>66</sub>H<sub>80</sub>N<sub>8</sub>O<sub>12</sub> (1177.36) erfordert N, 9.52%); Aminosäureanalyse: Ser (0.90); His (0.90); Leu (1.05); Glu (1.02); Val (0.99); Ala (1.00).

#### LITERATUR

- <sup>1</sup>Zusammenfassung K. Lübke und H. Klostermeyer, *Adv. Enzymol.* **33**, 445 (1970).
- <sup>2</sup>M. I. Titov, Z. A. Adremasova, Zh. D. Bespalova und L. I. Leontieva, *Dokl. Akad. Nauk SSR* **209**, 227 (1973).
- <sup>3</sup>G. P. Schwartz und P. G. Katsoyannis, *J. Chem. Soc.* **2894** (1973).
- <sup>4</sup>H. Rink und B. Riniker, *Helv. Chim. Acta* **57**, 831 (1974).

- <sup>5</sup>G. Losse, M. Mauck und H. Stange, *Tetrahedron* im Druck.
- <sup>6</sup>G. Losse und G. Müller, *Chem. Ber.* **94**, 2798 (1961).
- <sup>7</sup>G. Losse und U. Krychowski, *Tetrahedron Letters*, 4121 (1971).
- <sup>8</sup>G. Losse und U. Krychowski, *J. Prakt. Chem.* **312**, 1097 (1970).
- <sup>9</sup>W. König und R. Geiger, *Chem. Ber.* **103**, 788 (1970).
- <sup>10</sup>L. Zervas und M. Theodoropoulos, *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 1359 (1956).
- <sup>11</sup>E. Schnabel, *Liebigs Ann. Chem.* **702**, 188–96 (1967).
- <sup>12</sup>J. P. Greenstein und M. Winitz, *Chemie der Aminosäuren*, Wiley, New York (1960).
- <sup>13</sup>B. Kamber, *Helv. Chim. Acta* **54**, 413 (1971).
- <sup>14</sup>D. A. Laufer and E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 1246 (1967).
- <sup>15</sup>V. J. Hruby und K. W. Ehler, *J. Org. Chem.* **35**, 1690 (1970).
- <sup>16</sup>G. Amiard, R. Heymés und L. Velluz, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 698 (1956).