

SYNTHESE EINES KONDENSATIONSFÄHIGEN
INSULIN-B15-20-HEXAPEPTIDDERIVATES

G. LOSSE, K.-J. SCHUMACHER und H. STANGE
Sektion Chemie der Technischen Universität Dresden, DDR

(Received in Germany 30 September 1976)

Zusammenfassung—Es wird die Synthese des geschützten, zur Fragmentkondensation geeigneten Hexapeptides Boc-Leu-Tyr(Bzl)-Leu-Val-Cys(SEt)-Gly-OH[†] mit der Sequenz 15-20 der Insulin-B-Kette beschrieben.

Summary—The synthesis of the protected hexapeptide Boc-Leu-Tyr(Bzl)-Leu-Val-Cys(SEt)-Gly-OH with the sequence 15-20 of the insulin B chain suitable for fragment coupling is described.

Aus dem Insulin-Sequenzbereich B 15-20 wurden bisher verschiedene zur Weiterverlängerung geeignete Derivate der allgemeinen Form A-Leu-Tyr(B)-Leu-Val-Cys(C)-Gly-D (Tabelle 1) dargestellt und zur Gesamtsynthese der B-Kette herangezogen.

Wie bei der Teilsequenz B 1-8 ergibt sich auch hier bezüglich eines zweckmässigen Schutzes für Cystein-Schwefel ein generelles Problem der Insulinsynthese.⁹ In den älteren Publikationen wurde zum Aufbau dieses Hormons ausschliesslich der S-Benzylrest angewendet, was zur Wiederabspaltung die destruktive Na/NH₃-^{10,14} oder HF-Behandlung¹¹ erfordert. Man hat deshalb zum Aufbau von Insulinketten oder deren Teilsequenzen andere S-Schutzgruppen wie den *p*-Methoxybenzyl-,^{16,17} Benzhydryl-⁸ und Trityl-Rest^{18,19} erprobt, welche mit HF,^{15,16} durch andere Acidolysereaktionen^{19,21} oder jodolytisch²² entferntbar sind. Die Tritylgruppe lässt sich ausserdem durch Schwermetallsalze^{23,24} und mit Dirhodan^{25,26} abspalten.

Andere S-Schutzgruppen^{27,28} erfordern wiederum spezielle, ihrem chemischen Verhalten angepasste Aufbauaktiken. Unter kombinierter Anwendung von S-Acm mit S-Trityl-Gruppen gelang so kürzlich die Totalsynthese des Insulins.²⁹

Zwecks Neusynthese des Teilstückes B 15-20 ent-

Tabelle 1.

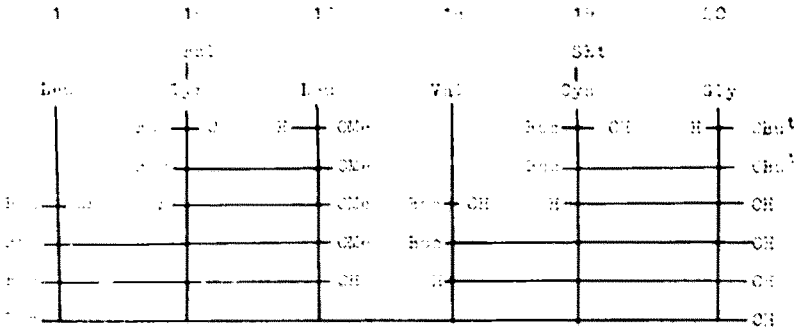
| A | B | C | D | Lit. |
|-----|-----|----------|-------------------------------|------|
| Z | Bzl | Bzl | CEt | 1 |
| Z | | Bzl | K ₂ H ₃ | 2 |
| Z | | Bzl | | 3,4 |
| Z | | Disulfid | OMe | 5 |
| Npe | | Disulfid | OMe | 6 |
| Z | Bzl | Bzl | OMe | 7 |
| Boc | Bzl | Bzh | | 8 |

schieden wir uns für die S-Äthylmercaptogruppe³⁰ als schutz für Cystein-Schwefel, ein Substituent, der sich schonend durch Thiolyse³⁰ oder Sulfityolyse^{31,32} wieder abtrennen lässt. Er ist hinreichend stabil unter den Bedingungen der N^ε-Boc-Deblockierung³¹ und wurde auch bei Festphasensynthesen von Insulinketten^{31,32} verwendet.

Die Synthese des Hexapeptidderivates B 15-20 erfolgt entsprechend Schema 1 aus den beiden Tripeptidderivaten Boc-Leu-Tyr(Bzl)-Leu-OH (15-17) und H-Val-Cys(SEt)-Gly-OH (18-20). Man erhält so das Gesamtfragment direkt als Peptidsäure mit freier Carboxylfunktion und vermeidet die wenig schonende Esterverseifung oder Hydrazinolyse in Gegenwart der S-Äthylmercaptogruppe.

Das bereits im Teilstück B 1-8¹¹ verwendete

[†] Abkürzungen nach den Regeln der IUPAC-IUB-Commission on Biochemical Nomenclature: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **348**, 256 (1967); *J. Biol. Chem.* **247**, 977 (1972); ferner bedeutet: TFE = Trifluoressigsäure, DCC = Dicyclohexylcarbodiimid, HOBt = N-Hydroxybenzotriazol.



Schema 1

H-Cys(SET)-Gly-OH wurde hierbei mit Boc-Valin zum Tripeptidderivat verlängert, wobei sich die N-Hydroxy-succinimid-Methode als besonders geeignet erwies, und ähnlich wie im Sequenzabschnitt B 6-8¹¹ die Boc-Gruppe mit 4 n HCl in Dioxan in Gegenwart eines 10- bis 20-fachen Überschusses von Äthylmercaptan entfernt. Unter diesen Bedingungen ist keinerlei Angriff auf die S-Äthylmercaptofunktion nachweisbar, während in Abwesenheit des Mercaptans unter denselben Bedingungen Spaltungsraten bis immerhin 6% auftreten können. Die Kondensation dieses Tripeptidderivates B 18-20 mit der ausgehend von Leucin-methylester durch schrittweisen Aufbau nach der DCC-Methode gewonnenen Tripeptidsäure B 15-17 führte unter Anwendung der racemisierungsarmen¹⁴ DCC/HOBT-Methode¹⁵ zum chromatographisch einheitlichen Gesamtfragment B 15-20.

Eine Verlegung der Schnittstelle zwischen die Positionen 18/19 im Sinne eines 4 + 2-Aufbaues erwies sich wegen der damit verbundenen Aktivierung der sterisch stärker gehinderten Valin-Carboxylgruppe als weniger günstig.

EXPERIMENTELLER TEIL

Die $[\alpha]_D^{25}$ -Werte wurden mit einer Genauigkeit von $\pm 0.5^\circ$, die $[\alpha]_D^{20}$ - und $[\alpha]_D^{15}$ -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); *Äthanol: H₂O: Benzol: Eisessig (40:20:10:5); *n-Butanol: Eisessig: H₂O: Pyridin (30:6:24:20); *n-Propanol: NH₄OH (70:30); *Äthanol: NH₄OH (4:1); *n-Butanol: Eisessig: H₂O (4:1:1); *Chloroform: Methanol (9:1).

1. Boc-Val-Cys(SET)-Gly-OH

1.9 g (8 mmol) HCl \times Cys(SET)-Gly-OH¹¹ werden in 15 ml DMF gelöst, mit 1.76 ml (16 mmol) N-Methylmorpholin versetzt, bei -13°C 1.2 g (8 mmol) HOBT und 2.52 g (9 mmol) Boc-Val-OSu (Schmp. $126-127^\circ\text{C}$)¹⁶ in 5 ml DMF hinzugefügt und 3 h bei -13°C , 4 h bei 0°C und 4 Tage bei Raumtemp. zur Reaktion gebracht. Das Lösungsmittel wird bei 10^{-2} Torr abgedampft, das resultierende Produkt in Essigester aufgenommen, mit Citronensäurelösung pH 3 mehrmals in der Kälte extrahiert, mit Wasser neutral gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die Essigesterphase extrahiert man dann mehrmals in der Kälte mit Bicarbonatlösung pH 8, die gesammelten Bicarbonatextrakte werden in der Kälte mit KHSO₄ auf pH 3-4 angesäuert und 8 \times mit Essigester extrahiert. Nach dem Neutralwaschen der Essigesterphase und dem Trocknen über MgSO₄ wird bei 20 Torr eingeeengt, in wenig Essigester aufgenommen und vorsichtig mit Petroläther gefällt. Als erste Fraktion fällt Tripeptidsäure Boc-Val-Cys(SET)-Gly-OH an, die über das DCHA-Salz (Schmp. $148-150^\circ$) aus Methanol/Äther gereinigt wird. Reinausbeute: 1.04 g (40% d. Th.), Schmp. $122-124^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} = -102.0^\circ$ (c = 1.0 in Methanol); $R_f = 0.70$ (Kf) $R_f = 0.30$ (Ka); Ellmanns-Reaktion negativ; (Gef. C, 46.90; H, 6.80; C₁₄H₂₁N₃O₈S₂ (437.57) erfordert C, 46.70; H, 7.08%). Aminosäureanalyse: Gly (1.00); Cys (0.97); Val (0.95).

Zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe werden 812 mg Boc-Val-Cys(SET)-Gly-OH mit 4 n HCl/Dioxan und 3.15 ml Äthylmercaptan versetzt und 30 Min. bei Raumtemp. gehalten. Dann gibt man viel Äther hinzu und dekantiert ab. Das ausgefallene Peptid-Hydrochlorid wird über P₂O₅ bei 10^{-2} Torr getrocknet. $R_f = 0.55$ (Sf).

2. Boc-Tyr(Bzl)-Leu-OME

1.82 g (10 mmol) Leu-OME \times HCl werden in 20 ml CH₂Cl₂ gelöst und bei 10°C die äquivalente Menge N-Methylmorpholin sowie 3.71 g (10 mmol) Boc-Tyr(Bzl)-OH in 10 ml CH₂Cl₂ hinzugefügt. Nach Zugabe von 2.26 g (12 mmol) DCC in 4 ml CH₂Cl₂ wird der Ansatz 2 h bei 10°C , 12 h bei 0°C und 3 Tage bei

Raumtemp. gerührt. Das überschüssige DCC wird mit einigen Tropfen Eisessig zerstört und der Dicyclohexylharnstoff abgesaugt. Nach Entfernen des Lösungsmittels bei 20 Torr wird in Essigester aufgenommen und mit Bicarbonatlösung pH 8 sowie Citronensäurelösung pH 3 je 10 \times extrahiert. Die mit Wasser neutral gewaschene Essigesterlösung wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und bei 20 Torr eingeeengt. Das geschützte Dipeptidderivat Boc-Tyr(Bzl)-Leu-OME wird aus Essigester/Petroläther kristallisiert. Ausbeute: 2.95 g (59% d. Th.), Schmp. $116-117^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} = -5.8^\circ$ (c = 1.0 in Methanol); $R_f = 0.80$ (Sf), $R_f = 0.80$ (Sa); (Gef. C, 67.47; H, 7.73; N, 5.65; C₂₂H₂₈N₂O₆ (498.60) erfordert C, 67.44; H, 7.68; N, 5.62%).

Zur Abspaltung der N¹-Schutzgruppe versetzt man eine Lösung von 0.7 g (1.46 mmol) Boc-Tyr(Bzl)-Leu-OME mit einem Gemisch aus je 3 ml CH₂Cl₂ und TFE und lässt 30 Min. bei Raumtemp. stehen. Bei 20 Torr werden anschließend TFE und CH₂Cl₂ abdestilliert, mehrmals mit wenig CH₂Cl₂ destilliert und das resultierende Produkt getrocknet. Umfallen mit Äther liefert ein weisses kristallines Produkt. Ausbeute: 670 mg (90% d. Th.), Schmp. $97-100^\circ\text{C}$; $R_f = 0.72$ (Sf); $R_f = 0.90$ (Sd); (Gef. N, 5.34; C₂₁H₂₇N₂O₆F₂ (512.50) erfordert N, 5.46%).

3. Boc-Leu-Tyr(Bzl)-Leu-OH

2.4 g (6 mmol) TFE \times Tyr(Bzl)-Leu-OME werden in 20 ml CH₂Cl₂ suspendiert, mit 0.84 ml (6 mmol) Et₃N versetzt, mehrmals mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und Wasser extrahiert und getrocknet. Nach dem Entfernen des Trocknungsmittels setzt man bei -10°C 2.31 g (10 mmol) Boc-Leu-OH und 2.26 g (11 mmol) DCC in 5 ml CH₂Cl₂ zu und rührt 2 h bei -10°C , 3 h bei 0°C und über Nacht bei Raumtemp. Der Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert, das Lösungsmittel bei 20 Torr abdestilliert, der Rückstand in Essigester aufgenommen, mit Bicarbonatlösung pH 8 und Citronensäurelösung pH 3 je 10 \times extrahiert, die Essigesterphase mit Wasser neutral gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach dem Einengen der Essigesterlösung bei 15 Torr wird das Tripeptidderivat Boc-Leu-Tyr(Bzl)-Leu-OME aus Essigester-Petroläther kristallisiert und anschließend gut mit Petroläther gewaschen. Ausbeute: 2.94 g (80% d. Th.), Schmp. $152-153^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} = -33.2^\circ$ (c = 1.0 in Methanol); $[\alpha]_D^{20} = 41.0^\circ$ (c = 1.0 in Methanol); $[\alpha]_D^{15} = 35.0^\circ$ (c = 1.0 in Methanol); $R_f = 0.63$ (Sa), $R_f = 0.87$ (Sf); (Gef. C, 66.71; H, 8.25; N, 6.86; C₂₄H₃₀N₂O₇ (611.76) erfordert C, 66.75; H, 8.07; N, 6.87%). Aminosäureanalyse: Leu (2.05); Tyr (1.00).

Zur Verseifung werden 2.32 g (3.8 mmol) Methyl ester in einem Gemisch von 20 ml Dioxan und 7 ml Wasser gelöst, mit 2.5 ml 2 n NaOH versetzt und 1 h bei Raumtemp. verseift.

Der Ansatz wird bei 1 Torr auf ca. 10 ml eingeeengt, mit 50 ml Essigester versetzt, bei 0°C mit 1 n HCl auf pH 3 angesäuert, die Essigesterphase mit Wasser neutral gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach dem Einengen der Lösung bei 15 Torr wird in wenig Essigester aufgenommen und mit wenig Petroläther versetzt. Die Tripeptidsäure Boc-Leu-Tyr(Bzl)-Leu-OH kristallisiert bei 0°C aus. Ausbeute: 2.1 g (93% d. Th.), Schmp. $175-177^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} = -27.4^\circ$ (c = 1.0 in Methanol); $[\alpha]_D^{20} = -29.0^\circ$ (c = 1.0 in Methanol); $[\alpha]_D^{15} = 34.0^\circ$ (c = 1.0 in Methanol); $R_f = 0.78$ (Sf), $R_f = 0.46$ (Sa); (Gef. C, 66.31; H, 7.98; N, 6.97; C₂₃H₂₈N₂O₇ (597.73) erfordert C, 66.31; H, 7.93; N, 7.03%).

4. Boc-Leu-Tyr(Bzl)-Leu-Val-Cys(SET)-Gly-OH (B 15-20)

600 mg (1 mmol) Boc-Leu-Tyr(Bzl)-Leu-OH und 135 mg (1 mmol) HOBT werden bei 18°C in 3 ml DMF gelöst und mit 206 mg (1 mmol) DCC in 2 ml DMF versetzt. Innerhalb von 2.5 h lässt man die Temperatur auf 0°C ansteigen und kühlt dann wieder auf 18°C ab, gibt 335 mg (1 mmol) HCl \times Val-Cys(SET)-Gly-OH, das mit 2 mmol N-Methylmorpholin versetzt wurde, in 2 ml DMF zu. Die Reaktion läuft 5 h bei 13°C , 12 h bei 5°C und 30 h bei Raumtemp. ab. Der Harnstoff wird abfiltriert und die DMF-Lösung mit wenig trockenem Äther versetzt. Hierbei fällt als erste Verbindung das Hexapeptidderivat Boc-Leu-Tyr(Bzl)-Leu-Val-Cys(SET)-Gly-OH (B 15-20) aus. Der Niederschlag wird in Methanol aufgenommen und durch Kieselgelchromatographie (50 \times 25 cm, Elutionsmittel: Chloroform: Methanol (9:1)) gereinigt. Reinausbeute: 350 mg (38% d. Th.), Schmp. 236° (zers.); $[\alpha]_D^{25} = 60.0^\circ$ (c = 0.4 in DMF); $[\alpha]_D^{20} = 50.0^\circ$ (c = 0.4 in

DMF); $[\alpha]_D^{20} = -47.1^\circ$ (c = 0.4 in DMF); $R_f = 0.50$ (Ka), $R_f = 0.80$ (Kc), $R_f = 0.84$ (Sf); Aminosäureanalyse: Leu (1.04); Tyr (0.95); Leu (1.03); Val (0.97); Cys (0.96); Gly (1.00). (Gef. N, 9.30. $C_{44}H_{66}N_6O_{10}S_2$ (917.2) erfordert N, 9.04).

LITERATUR

- ¹P. G. Katsoyannis und M. Tilak, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 4028 (1963).
- ²P. G. Katsoyannis, A. M. Tometsko, J. Z. Vinos und M. Tilak, *Ibid.* **88**, 164 (1966).
- ³J. Meienhofer und E. Schnabel, *Z. Naturforschg.* **20b**, 661 (1965).
- ⁴H. Zahn, J. Meienhofer und E. Schnabel, *Acta Chim. Hung.* **44**, 109 (1965).
- ⁵M. I. Titov, Zh. D. Bespalova und L. I. Leontieva, *Zh. Obshch. Khim.* **41**, 928 (1971).
- ⁶M. I. Titov, Z. A. Adremasova, Zh. D. Bespalova und L. I. Leontieva, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **209**, 227 (1973).
- ⁷N. A. Kotscharova, W. F. Krivzov und Y. P. Shvachkin, *Zh. Obshch. Khim.* **44**, 696 (1974).
- ⁸G. P. Schwartz und P. G. Katsoyannis, *J. Chem. Soc. (Perkin Tr.)* 2890 (1973).
- ⁹Zusammenfassung K. Lübke und H. Klostermeyer, *Adv. Enzymol.* **33**, 445 (1970).
- ¹⁰K. Jost und J. Rudinger, *Coll. Czech. Chem. Commun.* **32**, 1229 (1967).
- ¹¹H. Zahn und T. Okuda, *Makromol. Chem.* **121**, 87 (1969).
- ¹²Y. Shimonishi, H. Zahn und W. Puls, *Z. Naturforschg.* **24b**, 422 (1969).
- ¹³P. G. Katsoyannis, A. M. Tometsko, C. Zalut und K. Fukuda, *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 5625 (1966).
- ¹⁴L. Zervas, *Peptides 1966*, S. 112. North Holland, Amsterdam (1967).
- ¹⁵S. Sakakibara, Y. Shimonishi, M. Okuda und I. Kishida, *Ibid.* S. 44 (1967).
- ¹⁶H. Zahn, W. Danho, G. Schmidt, J. Dahlmans, A. Costopanagiotis u. E. Engels, *Peptides 1968*, S. 217. North Holland, Amsterdam (1968).
- ¹⁷K. Hammerström, W. Lunkenheimer und H. Zahn, *Makromol. Chem.* **133**, 41 (1970).
- ¹⁸H. Zahn, W. Danho, H. Klostermeyer, H. G. Gattner und J. Repin, *Z. Naturforschg.* **24b**, 1127 (1969).
- ¹⁹I. Photaki, J. Taylor-Papadimitrou, C. Sakarellos, P. Mazarakis und L. Zervas, *J. Chem. Soc.* 2683 (1970).
- ²⁰L. Zervas, I. Photaki und I. Phocas, *Chem. Ber.* **101**, 3332 (1968).
- ²¹W. König, R. Geiger und W. Siedel, *Ibid.* **101**, 681 (1968).
- ²²B. Kamber und W. Rittel, *Helv. Chim. Acta* **51**, 2061 (1968).
- ²³L. Zervas und I. Photaki, *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 3887 (1962).
- ²⁴L. Zervas, I. Photaki, A. Cosmotos und D. Borovas, *Ibid.* **87**, 4922 (1965).
- ²⁵R. G. Hiskey, A. M. Thomas, R. L. Smith und W. C. Jones, *Ibid.* **91**, 7525 (1969).
- ²⁶R. G. Hiskey und J. T. Sparrow, *J. Org. Chem.* **35**, 215 (1970).
- ²⁷G. Losse und Th. Stölzel, *Tetrahedron* **28**, 3049 (1972).
- ²⁸I. Photaki, *The Chemistry of Polypeptides*, S. 59. Plenum, New York (1974).
- ²⁹P. Sieber, B. Kamber, A. Hartmann, A. Jöhl, B. Riniker und W. Rittel, *Helv. Chim. Acta* **57**, 2617 (1974).
- ³⁰N. Inukai, K. Nakano und M. Murakami, *Bull. Chem. Soc. Jap.* **40**, 2915 (1967); **41**, 182 (1968).
- ³¹U. Weber, K. Herzog, H. Grossmann, S. Hörnle und G. Weitzel, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **350**, 1425 (1969).
- ³²U. Weber, *Ibid.* **350**, 1421 (1969).
- ³³G. Losse, M. Mauck und H. Stange, *Tetrahedron* **33**, 1813 (1977).
- ³⁴D. S. Kemp, M. Trangle und K. Trangle, *Tetrahedron Letters* 2695 (1974).
- ³⁵W. König und R. Geiger, *Chem. Ber.* **103**, 788 (1970).
- ³⁶G. W. Anderson, J. E. Zimmerman und F. M. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1839 (1964).