

Peter Fehrenbach und Helmut Zahn

Peptide, 86¹⁾

Synthese und immunologische Eigenschaften zweier symmetrischer Cystinpeptide mit den Sequenzen A 14—21 und A 15—21 der Insulin-A-Kette²⁾

Aus dem Deutschen Wollforschungsinstitut an der Technischen Hochschule, D-51 Aachen (Eingegangen am 28. Januar 1972)

Die vollständig geschützten Cystinpeptide [Z-Gln-Leu-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-Cys-Asn-OBzl]₂ (10) bzw. [Z-Tyr(Bu^t)-Gln-Leu-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-Cys-Asn-OBzl]₂ (11), deren Aminosäurefolgen den Sequenzen A 15—21 bzw. A 14—21 der Insulin-A-Kette entsprechen, wurden durch Kondensation eines Pentapeptid-Derivates (5) bzw. eines Hexapeptid-Derivates (8) über das Azid mit dem bifunktionellen Cystinpeptid (9) hergestellt und durch Behandlung mit Bromwasserstoff in Trifluoressigsäure in die schutzgruppenfreien Cystinpeptide 12 bzw. 13 übergeführt. Im Test auf passive cutane Anaphylaxie erwies sich das Cystinpeptid (A 14—21)₂ (13) als immunologisch aktiv.

Synthesis and Immunological Properties of Two Symmetrical Cystine Peptides with the Sequences A 14—21 and A 15—21 of the Insulin A Chain²⁾

The fully protected cystine peptides [Z-Gln-Leu-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-Cys-Asn-OBzl]₂ (10) and [Z-Tyr(Bu^t)-Gln-Leu-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-Cys-Asn-OBzl]₂ (11), the amino acid sequences of which correspond to sequences A 15—21 and A 14—21 of the insulin A chain, respectively, were prepared by condensation of either a penta (5)- or a heptapeptide (6) derivative *via* the azide with a bifunctional cystine peptide (9). These were then converted into the corresponding deblocked cystine peptide (12 or 13) by treatment with hydrogen bromide in trifluoroacetic acid. The (A 14—21)₂ cystine peptide (13) showed immunological activity in the passive cutaneous anaphylaxia test.

Nach Wilson u. a.³⁾ verursacht das monomer-cyclische Cystinpeptid der Sequenz A 10—21⁴⁾ der Human-Insulin-A-Kette⁵⁾ im Test auf passive cutane Anaphylaxie am Meerschweinchen (PCA-Test) die allgemeinen Symptome der Anaphylaxie. Das

1) 85. Mitteil. vgl. D. Brandenburg, H.-G. Gattner und A. Wollmer, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., im Druck. 84. Mitteil.: D. Brandenburg, A. Lange und M. Leithäuser, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 353, 263 (1972).

2) Abkürzungen nach den vorläufigen Regeln der IUPAC-IUB-Commission on Biochemical Nomenclature; vgl. auch Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 256 (1967).

3) S. Wilson, Diabetes, Proc. 6. Congr. Fed., Stockholm 1967, Excerpta Medica Foundation Int. Congr. Series Nr. 172, 164 (1969).

4) H. Zahn und E. Th. J. Fölsche, Liebigs Ann. Chem. 716, 164 (1968).

5) D. S. H. W. Nicol und L. F. Smith, Nature [London] 187, 483 (1960).

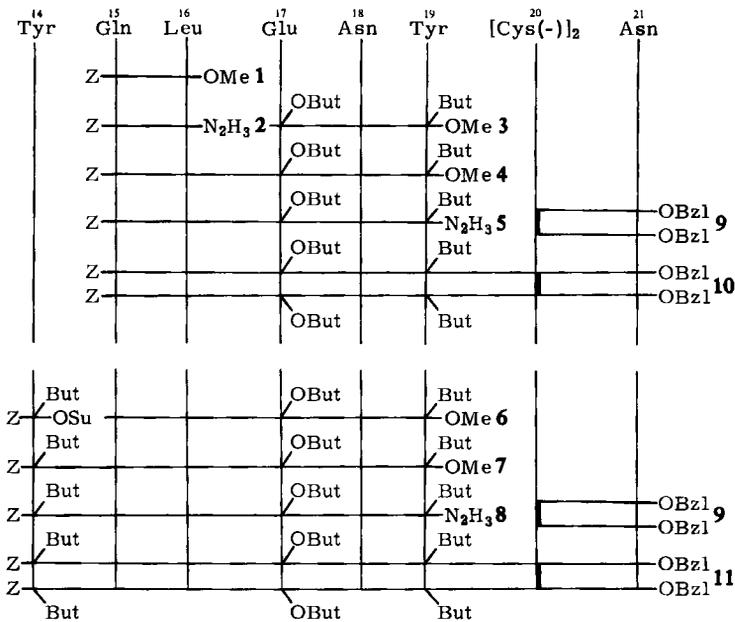
offen-symmetrische Cystinpeptid (A 13–21)₂⁴⁾ reagiert im PCA-Test in abgeschwächter Form, das Cystinpeptid (A 17–21)₂⁴⁾ erweist sich dagegen als immunologisch inaktiv.

Zur weiteren Lokalisierung der Antigenstellen im C-terminalen Bereich der Insulin-A-Kette ist daher der PCA-Test der Cystinpeptide (A 15–21)₂ (12) und (A 14–21)₂ (13) von Interesse, zumal nach *Arquilla* u.a.⁶⁾ vor allem die Tyrosylreste in den Positionen A 14 und A 19 den antigenen Charakter dieses Bereiches bestimmen.

Synthese der Cystinpeptide

Die Synthese der geschützten Cystinpeptide **10** und **11** (vgl. Syntheseplan unten) erfolgte nicht über *S*-geschützte Cysteinpeptide (vgl. l. c.⁴⁾), vielmehr wurde auch hier Cystin direkt als Synthesebaustein eingesetzt (vgl. l. c.⁷⁾). Das Pentapeptid **5** bzw. das Hexapeptid **8** dienten als Carboxylkomponenten bei den abschließenden Azidkondensationen⁸⁾. Fragmente mit *C*-terminalem *O*-tert.-butyliertem Tyrosin – wie hier die Derivate **5** und **8** – hatten sich bereits mehrfach als geeignete Carboxylkomponenten bei Azidkondensationen erwiesen^{7,9,10)}.

Syntheseplan für die geschützten Cystinpeptide **10** und **11**



OSu = *N*-Hydroxy-succinimid-Ester, But = tert.-Butyl

6) *E. R. Arquilla, H. Ooma und J. Finn, Diabetologia* **2**, 1 (1966).

7) *H. Zahn und G. Schmidt, Liebigs Ann. Chem.* **731**, 91 (1970).

8) *J. Honzl und J. Rudinger, Collect. czechoslov. chem. Commun.* **26**, 2333 (1961).

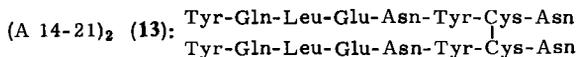
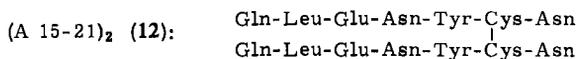
9) *M. Kinoshita und H. Klostermeyer, Liebigs Ann. Chem.* **696**, 226 (1966).

10) *M. Kinoshita und H. Klostermeyer, Liebigs Ann. Chem.* **696**, 234 (1966).

Der Pentapeptid-methylester **4** wurde aus den Fragmenten **2** und **3**¹¹⁾ über das Azid⁸⁾ in glatter Reaktion gewonnen. Der zur Herstellung des Hydrazides **2** benötigte Dipeptid-methylester **1**¹²⁾ wurde nicht nach der Nitrophenylester-Methode, sondern über das gemischte Anhydrid synthetisiert. Durch katalytische Hydrierung wurde **4** zum Pentapeptid-amin **6** debenzoyloxycarbonyliert und dieses mit Benzoyloxycarbonyl-*O*-tert.-butyl-tyrosin-succinimidester¹³⁾ zum Hexapeptid-methylester **7**¹⁴⁾ umgesetzt. Die Hydrazinolyse der Methylester **4** bzw. **7** lieferten ohne Schwierigkeiten das Pentapeptid-hydrazid **5** bzw. das Hexapeptid-hydrazid **8**.

Um die Bildung unsymmetrischer Cystinpeptide bei der abschließenden Kondensation zu vermeiden, wurden die Hydrazide **5** bzw. **8** im Überschuß in die Azidkupplung mit dem Cystinpeptid **9**¹⁵⁾ eingesetzt. Die Reinigung der so erhaltenen, vollständig geschützten Cystinpeptide **10** bzw. **11** bereitete auf Grund ihrer extremen Schwerlöslichkeit in organischen Lösungsmitteln einige Schwierigkeiten. Sie beschränkte sich auf wiederholtes Auskochen mit Methanol und auf Umfällen aus Dimethylformamid/Methanol. Die dünnschichtchromatographisch nachweisbaren Verunreinigungen konnten dabei nicht quantitativ entfernt werden.

Durch zweistündige Behandlung mit Bromwasserstoff in Trifluoressigsäure¹⁶⁾ unter Zusatz von Anisol¹⁷⁾ wurden die Schutzgruppen der Cystinpeptide **10** und **11** abgespalten. Die als Dihydrobromide anfallenden ungeschützten Cystinpeptide **12** und **13** konnten nun durch Gelfiltration über Sephadex G 25 in 0.1 *m* Ammoniumhydrogencarbonat bei pH 8.0 gereinigt werden. Ihre Einheitlichkeit wurde elektro-phoretisch nachgewiesen, ihr Disulfidgehalt polarographisch¹⁸⁾ bestimmt.



Antigenaktivitäten der Cystinpeptide **12** und **13**

Nach *Wilson*¹⁹⁾ zeigt das Cystinpeptid (A 15–21)₂ (**12**) selbst bei einer intravenösen Dosis von 1000 μ /kg im PCA-Test keine Reaktionen, weder mit Meer-schweinchen-Antiserum gegen Rinder-Insulin, noch mit Antiserum gegen Rinder-Insulin-A-Kette. Dagegen reagiert das Cystinpeptid (A 14–21)₂ (**13**) zwar auch nicht

¹¹⁾ *H. Zahn, W. Danho, H. Klostermeyer, H.-G. Gattner und J. Repin, Z. Naturforsch.* **24b**, 1127 (1969).

¹²⁾ *P. G. Katsoyannis, K. Suzuki und A. Tometsko, J. Amer. chem. Soc.* **85**, 1139 (1963).

¹³⁾ *K. B. Mathur, H. Klostermeyer und H. Zahn, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **346**, 60 (1966).

¹⁴⁾ *E. Engels, Dissertation Techn. Hochschule Aachen 1970.*

¹⁵⁾ *E. Engels, Diplomarbeit Techn. Hochschule Aachen 1967.*

¹⁶⁾ *St. Guttman und R. A. Boissonnas, Helv. chim. Acta* **42**, 1257 (1959).

¹⁷⁾ *F. Weygand und K. Hunger, Chem. Ber.* **95**, 1 (1962).

¹⁸⁾ *S. J. Leach, Austral. J. Chem.* **13**, 520 (1960).

¹⁹⁾ *S. Wilson, Diabetes, Proc. 7. Congr., Buenos Aires 1970, Excerpta Medica Foundation, Int. Congr. Series, im Druck.*

mit Antiserum gegen Rinder-Insulin, jedoch schon bei einer Dosis von 20 γ /kg mit Antiserum gegen Rinder-Insulin-A-Kette und bei einer Dosis von 1 γ /kg bereits mit Antiserum gegen ein Gemisch aus Rinder-Insulin-A- und B-Kette. Diese sowie frühere Befunde³⁾ zeigen nach *Wilson*, daß vor allem der Tyrosylrest in der Position A 14 dem C-terminalen Bereich der Insulin-A-Kette antigenen Charakter verleiht.

Wir danken dem *Landesamt für Forschung beim Minister für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen* für die Ermöglichung der vorliegenden Arbeit, sowie der *Deutschen Forschungsgemeinschaft*, Bad Godesberg, für die Förderung des Forschungsvorhabens. Ferner danken wir dem *Verband der Chemischen Industrie* für die Überlassung von Chemikalien und dem *Chemiefonds* für finanzielle Unterstützung.

Herrn Dr. *S. Wilson*, Toronto, danken wir für die Erlaubnis, die immunologischen Messungen an den Cystinpeptiden zu zitieren. Herrn Dr. *H.-G. Gattner* danken wir für die Bestimmung des Disulfidgehaltes, Herrn Dr. *H. Klostermeyer* für die Aminosäureanalysen.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Monoskop bestimmt und sind nicht korrigiert. — Die Dünnschichtchromatographie wurde auf Kieselgel HF₂₅₄ (Merck) mit den Laufmitteln SBA (sek.-Butanol/Ameisensäure/Wasser = 75:13.5:11.5, v/v), und CMA (Chloroform/Methanol/Essigsäure = 95:5:3, v/v) ausgeführt. — Die Papierelektrophoresen erfolgten auf Papier Nr. 2043 a Mgl (Schleicher & Schüll) in einem Elphor-H-Gerät nach Graßmann und Hannig. — Bei der Säulenchromatographie wurden die Fraktionen durch kontinuierliche Messung der UV-Absorption bei 253 nm mit einem Uvicord-Gerät der Fa. LKB-Produkte, Stockholm, registriert. — Zusätzliche Abkürzungen²⁾: DMF = Dimethylformamid, THF = Tetrahydrofuran.

Z-Gln-Leu-N₂H₃ (2): 9.2 g (22.6 mMol) *Z-Gln-Leu-OMe* (1)¹²⁾ in 60 ccm Methanol wurden mit 1.2 ccm (25 mMol) *Hydrazinhydrat* versetzt. Nach 48 Stdn. bei 40° und bei Raumtemperatur wurde das ausgefallene Reaktionsprodukt abfiltriert, mit wenig Methanol ausgekocht, mit Äther verrieben und getrocknet. Ausb. 7.3 g (79%), Schmp. 239°; $[\alpha]_D^{25}$: -14.5° (*c* = 1, DMF).

C₁₉H₂₉N₅O₅ (407.5) Ber. C 56.00 H 7.17 N 17.18 Gef. C 56.51 H 7.16 N 17.14

Z-Gln-Leu-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-OMe (4): Eine Lösung von 2.7 g (6.45 mMol) 2 in 50 ccm DMF wurde bei -20° mit 9.9 ccm 3.06 *n* (30 mMol) *HCl*/THF und mit 0.95 ccm (7 mMol) *Isoamylnitrit* versetzt. Nach 30 Min. wurde auf -40° gekühlt und mit 4.2 ccm (30 mMol) *Triäthylamin* neutralisiert. In die Azidlösung wurde eine Lösung aus 3.5 g (6.45 mMol) *Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-OMe* (3)¹¹⁾ in 30 ccm DMF eingetragen. Die Temperatur stieg in 21 Stdn. auf +3°; nach 3 Tagen bei 0° wurde das Reaktionsprodukt in Wasser gefällt, abgesaugt und zweimal aus Methanol gefällt. Ausb. 4.5 g (75%), Schmp. 228–230°, $[\alpha]_D^{25}$: +14.7° (*c* = 1, DMF)

C₄₆H₆₇N₇O₁₃ (926.1) Ber. C 59.60 H 7.28 N 10.60 Gef. C 59.13 H 7.10 N 10.56

Z-Gln-Leu-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-N₂H₃ (5): Eine Lösung von 0.92 g (1 mMol) 4 in 15 ccm DMF wurde bei 0° mit 0.45 ccm *Hydrazinhydrat* versetzt. Nach 2 Tagen bei 0° wurde das Reaktionsprodukt in Eiswasser gefällt, abgesaugt, zweimal mit Methanol ausgekocht, mit Äther verrieben und getrocknet. Ausb. 0.76 g (83%), Schmp. 232–234°; $[\alpha]_D^{25}$: -28.1° (*c* = 1, DMF).

C₄₅H₆₇N₉O₁₂ (926.1) Ber. C 58.30 H 7.28 N 13.61 Gef. C 57.97 H 7.20 N 13.60

Z-Tyr(Bu^t)-Gln-Leu-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-N₂H₃ (8): Eine Lösung von 1.8 g (1.5 mMol) 7¹⁴⁾ in 20 ccm DMF wurde mit 1.5 ccm *Hydrazinhydrat* versetzt. Nach 2 Tagen bei 0° wurde das Reaktionsprodukt in Eiswasser gefällt, abgesaugt, zweimal mit Methanol ausgekocht, mit Äther verrieben und getrocknet. Ausb. 1.5 g (80%), Schmp. 235°; $[\alpha]_D^{25}$: -28.5° ($c = 1$, DMF).

C₅₈H₈₄N₁₀O₁₄ (1145.4) Ber. C 60.80 H 7.40 N 12.20 Gef. C 59.81 H 7.34 N 11.90

[Z-Gln-Leu-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-Cys-Asn-OBzl]₂ (10): Eine auf -20° gekühlte Lösung von 0.86 g (0.92 mMol) 5 in 17 ccm DMF wurde mit 1.5 ccm (4.66 mMol) 3.06 *n HCl*/THF und 0.13 ccm (0.93 mMol) *Isoamylnitrit* versetzt, nach 30 Min. auf -40° gekühlt und mit 0.65 ccm (4.66 mMol) *Triäthylamin* neutralisiert. In die Azidlösung wurden bei -40° 0.35 g (0.4 mMol) des als Bis-trifluoracetat vorliegenden 9¹⁵⁾ — gelöst in 5 ccm DMF und neutralisiert mit 0.11 ccm (0.8 mMol) *Triäthylamin* — eingetragen. Die Temperatur stieg in 14 Stdn. auf 0°. Nach 3 Tagen bei 0° wurde das Reaktionsprodukt in Eiswasser gefällt, abgesaugt, zweimal mit Methanol ausgekocht und aus DMF/Methanol gefällt. Ausb. 0.58 g (57%), Schmp. 245–250° (Zers.); $[\alpha]_D^{25}$: -79.5° ($c = 1$, DMF).

C₁₁₈H₁₆₂N₂₀O₃₂S₂ (2436.9) Ber. C 58.31 H 6.71 N 11.50 S 2.73

Gef. C 57.13 H 6.70 N 11.60 S 2.87

[Z-Tyr(Bu^t)-Gln-Leu-Glu(OBu^t)-Asn-Tyr(Bu^t)-Cys-Asn-OBzl]₂ (11): Eine auf -20° gekühlte Lösung von 1.26 g (1.1 mMol) 8 in 20 ccm DMF wurde mit 1.78 ccm (5.5 mMol) 3.1 *n HCl*/THF und mit 0.76 ccm (1.2 mMol) *Isoamylnitrit* versetzt, nach 30 Min. auf -40° gekühlt und mit 0.76 ccm (5.5 mMol) *Triäthylamin* neutralisiert. In die Azidlösung wurden 0.44 g (0.5 mMol) des als Bis-trifluoracetat vorliegenden 9¹⁵⁾ — gelöst in 5 ccm DMF und neutralisiert mit 0.14 ccm (1 mMol) *Triäthylamin* — eingetragen. Die Temperatur stieg in 14 Stdn. auf +3°. Nach 3 Tagen bei 0° wurde das Reaktionsprodukt in Eiswasser gefällt, abgesaugt, mit Wasser gut gewaschen und zweimal mit Methanol ausgekocht. Ausb. 1.1 g (76%), Schmp. 235° (Zers.); $[\alpha]_D^{25}$: -56.5° ($c = 1$, DMF).

C₁₄₄H₁₉₆N₂₂O₃₆S₂ (2875.5) Ber. C 60.02 H 6.88 N 10.74 S 2.23

Gef. C 60.04 H 6.85 N 11.80 S 2.07

[Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn]₂ (12): In eine Lösung von 200 mg 10 und 0.2 ccm Anisol¹⁷⁾ in 15 ccm Trifluoressigsäure wurde trockener *Bromwasserstoff*¹⁶⁾ eingeleitet. Nach 2 Stdn. wurde i. Vak. eingengt, der Rückstand mit Äther verrieben, abgesaugt, mit Äther gut gewaschen und über P₂O₅/KOH getrocknet. Das Rohprodukt (138 mg, 90%) wurde in 10 ccm 0.1 *n* NH₄HCO₃ auf eine Sephadex-G-25-Säule (137 × 1.8 cm) aufgetragen und mit 0.1 *n* NH₄HCO₃ bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 37 ccm/Stde. eluiert. Bei der kontinuierlichen Messung der UV-Absorption des Eluats wurden vor und nach dem Hauptpeak je ein kleinerer Peak registriert. Die zum Hauptpeak gehörende Fraktion wurde gefriergetrocknet, in 10 ccm 1proz. Essigsäure über eine Sephadex-G-25-Säule (145 × 1.8 cm) in 1proz. Essigsäure rechromatographiert (Durchflußgeschwindigkeit: 37 ccm/Stde.). Die zum einzigen Peak gehörende Fraktion lieferte nach Gefriertrocknung 79 mg (59%) 12, Schmp. 235° (Zers.); $[\alpha]_D^{25}$: -40.4° ($c = 0.5$, Wasser).

*Aminosäureanalyse*²⁰⁾ (Totalhydrolysat mit 6 *n* HCl, 110°, 24 Stdn., bei Zusatz von Phenol):

4.14 Asp, 4.00 Glu, 0.95 [Cys]₂, 2.04 Leu, 1.92 Tyr.

²⁰⁾ D. H. Spackmann, W. H. Stein und S. Moore, *Analytic. Chem.* 30, 1190 (1958).

*Disulfidbestimmung*¹⁸⁾: 108% S—S. Papierelektrophorese: in Michaelis-Puffer (Barbital/Natriumacetat), pH 8.6, 220 V, 1 Stde. nur eine anionisch wandernde Bande.

$C_{72}H_{106}N_{20}O_{28}S_2$ (1763.9) Ber. C 49.03 H 6.06 N 15.90 S 3.64

Gef. C 47.42 H 6.28 N 15.02 S 3.70

[*Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn*]₂ (13): In eine Lösung von 500 mg **11** und 0.4 ccm Anisol in 15 ccm Trifluoressigsäure wurde trockener *Bromwasserstoff* eingeleitet. Nach 2 Stdn. wurde i. Vak. eingeengt, der Rückstand mit Äther verrieben, abgesaugt, gut mit Äther gewaschen und über P_2O_5/KOH getrocknet. Rohausb. 350 mg (95%) **13**. 150 mg **13** wurden in 15 ccm 0.1 n NH_4HCO_3 gelöst, auf eine Sephadex-G-25-Säule (80 × 2 cm) aufgetragen und mit 0.1 n NH_4HCO_3 bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 50 ccm/Stde. eluiert. Bei der kontinuierlichen Messung der UV-Absorption des Eluats wurden vor und nach dem Hauptpeak je ein kleinerer Peak registriert. Die zum Hauptpeak gehörende Fraktion lieferte nach Gefriertrocknung 80 mg (55%) **13**. Schmp. 253° (Zers.); $[\alpha]_D^{25}$: -30.8° (c = 0.5, Wasser).

*Aminosäureanalyse*²⁰⁾ (Totalhydrolysat mit 6 n HCl, 110°, 24 Stdn., unter Zusatz von Phenol):

4.10 Asp, 4.05 Glu, 1.05 [Cys]₂, 2.00 Leu, 3.90 Tyr.

*Disulfidbestimmung*¹⁸⁾: 108% S—S. Papierelektrophorese: in Michaelis-Puffer (Barbital/Natriumacetat) pH 8.6, 110 V, 4 Stdn. nur eine anionisch wandernde Bande.

$C_{90}H_{132}N_{22}O_{32}S_2$ (2090.4) Ber. C 51.75 H 5.98 N 14.76 S 3.07

Gef. C 50.61 H 6.17 N 14.08 S 3.02

[29/72]