38. Synthese der Sequenz 1-34 von menschlichem Parat-hormon

Vorläufige Mitteilung¹)²)

von R. H. Andreatta. A. Hartmann, A. Jöhl, B. Kamber, R. Maier, B. Riniker, W. Rittel und P. Sieber

Forschungslaboratorien der Division Pharmazcutika der CIBA-GEIGY AG, Basel

(5.1.72)

Summary. Brewer et al. [1] have established sequence I for the first 34 amino acid residues of human parathyroid hormone. It differs in 6 and 5 positions respectively from the corresponding bovine [2] [3] and porcine [4] hormone sequences. The synthesis of the protected tetratriacontapeptide II by the fragment-coupling approach and its purification by counter-current distribution are described. Removal of the protecting groups by acidolysis then gave I in high purity.

I displays hypercalcemic activity in the thyroparathyroidectomized rat indicating that the amino terminal part also constitutes the hormonally active region of human parathyroid hormone.

Brewer et al. $[1]^3$) ist kürzlich die Isolierung und Reindarstellung von menschlichem Parat-hormon (*h*-PTH) aus menschlichen Nebenschilddrüsenadenomen gelungen; diese Autoren konnten zeigen, dass dem N-terminalen Bereich 1-34 des Hormons die Aminosäuresequenz I (vgl. Schema 1) zukommt. *h*-PTH unterscheidet sich somit merklich in diesem Sequenzteil von bovinem [2] [3] oder porcinem [4] PTH.

Im folgenden beschreiben wir kurz Synthese und Charakterisierung des h-PTH-Fragmentes 1-34 (I).

Aminosäuresequenz des freien (
$$\mathbb{R}^1 = \mathbb{R}^2 = \mathbb{H}$$
; I) und des geschützten ($\mathbb{R}^1 = \operatorname{Boc}$, $\mathbb{R}^2 = \operatorname{Bu}^t$; II)
 h -PTH-(1-34)-tetratriacontapeptids
 $\mathbb{R}^2 \quad \mathbb{R}^2 \quad O\mathbb{R}^2$
 $\mathbb{R}^1 \quad \mathbb{R}^2 \quad O\mathbb{R}^2$
 $\mathbb{R}^1 \quad \mathbb{R}^2 \quad O\mathbb{R}^2$
 $\mathbb{R}^1 - \operatorname{Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Mct-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
 $\mathbb{R}^1 \quad \mathbb{R}^1 \quad \mathbb{R}^1$
 $\mathbb{G}ln-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Lys-Gln-Leu-Val-His-Asn-PheO\mathbb{R}^2$
 $22 \quad 23 \quad 24 \quad 25 \quad 26 \quad 27 \quad 28 \quad 20 \quad 30 \quad 31 \quad 32 \quad 33 \quad 34$$

Beschreibung der Synthese. Aus den in der Tabelle aufgeführten Zwischenprodukten III-XII baute man auf dem in Schema 2 angegebenen Weg die geschützte Endsequenz 1-34 (II) auf.

¹⁾ Eine ausführliche Beschreibung soll später in dieser Zeitschrift erfolgen.

²⁾ Verwendete Abkürzungen: Boc-: t-Butyloxycarbonyl-; Bpoc-: 2-(p-Biphenylyl)-isopropyloxycarbonyl-[5]; But-: t-Butyl-; DCCI: Dicyclohexylcarbodiimid; HOBt: 1-Hydroxybenzotriazol; Trt-: Trityl-; Z-: Benzyloxycarbonyl-.

³⁾ Diesen Autoren sind wir für die frühzeitige Überlassung der Information über die Struktur von I zu grossem Dank verpflichtet. Ebenso danken wir der Europäischen Parathormon-Studiengruppe für die Ermöglichung der Zusammenarbeit mit der amerikanischen Forschergruppe.

		1 abcile, 1 otherin wer geschwarzen z westwerproutine 1 1 - V 1
Nr.	Sequenz	Formel
III	2934	H-Gin-Leu-Val-His-Asn-Phe-OBu ^t
IV	25-28	H® Boc Boc Boc Z-Arg-Lys-Lys-O⊖
Δ	25-34	$\begin{array}{c c} \mathbf{H}^{\oplus} \ \mathrm{Boc} \ \mathrm{Boc} \ \mathrm{Boc} \ \mathrm{Boc} \\ & & \\ \mathbf{H}_{2}^{\oplus} - \mathrm{Arg}\mathrm{-Lys}\mathrm{-Lys}\mathrm{-Lys}\mathrm{-Gln}\mathrm{-Leu}\mathrm{-Val}\mathrm{-His}\mathrm{-Asn}\mathrm{-Phe}\mathrm{-OBu}^{t} \cdot 3\mathrm{Cl}^{\ominus} \end{array}$
ΙΛ	18-24	OBut H⊕ Arg-Val-Cln-Trp-Leu-O⊖
IIV	18-34	OBut H [®] H [®] Boc Boc Boc H [®] H ₂ [®] -Met-GluÅrg-Val-Gln-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Gln-Leu-Val-His-Asn-Phe-OBut ·4 Cl [®]
NIIV	13-17	$\begin{array}{ccc} \operatorname{Boc} & \operatorname{Bu}^t \\ & \\ \operatorname{Bpoc-Lys-His-Leu-Asn-Ser-NHNH}_2 \end{array}$
XI	13-34	$\begin{array}{ccccccc} \operatorname{Boc} \operatorname{H}^{\oplus} & \operatorname{Bu}^t & \operatorname{OBu}^t \operatorname{H}^{\oplus} & \operatorname{H}^{\oplus} & \operatorname{Boc} \operatorname{Boc} \operatorname{Boc} & \operatorname{H}^{\oplus} \\ \operatorname{H}_{2}^{\oplus-1} & & & & & & & \\ & & & & & & & \\ \operatorname{H}_{2}^{\oplus-1} \operatorname{Lys}\text{-}\operatorname{His}\text{-}\operatorname{Lys}\text{-}\operatorname{Ch}\text{-}\operatorname{Asn}\text{-}\operatorname{Sen}\text{-}\operatorname{Phe}\text{-}\operatorname{OBu}^t \cdot 5\operatorname{Cl}^{\oplus} \\ \end{array}$
x	4-12	OBut Trt-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-OH
IX	4-34	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
		Boc H [®] Lys-Gln-Leu-Val-His-Asn-Phe-OBu ^t ·6Cl [©]
XII	1- 3	$\begin{array}{ccc} \mathrm{Bu}^t & \mathrm{Bu}^t \\ & & \\ \mathrm{Boc-Ser-Val-Ser-NHNH}_{2} \end{array}$

Tabelle. Formeln der geschützten Zwischenprodukte III-XII

Schema 2. Aufbau des geschützten Tetratriacontapeptids 1-34 (II) (Zu den Formeln der verwendeten Zwischenprodukte vgl. Tabelle)

$$\begin{array}{c} \text{III} \\ (29-34) \\ \text{IV} \\ (25-28) \end{array} \right\} \xrightarrow{1. \text{ A}} V \\ (25-34) \\ \text{VI} \\ (18-24) \end{array} \right\} \xrightarrow{1. \text{ A}} V\text{III} \\ (18-34) \\ \text{VIII} \\ (13-17) \end{array} \right\} \xrightarrow{1. \text{ D}} IX \\ (13-34) \\ \text{X} \\ (4-12) \end{array} \xrightarrow{1. \text{ A}} XI \\ (4-34) \\ \text{XII} \\ (1-3) \end{array} \right\} \xrightarrow{D} III$$

Methoden: A: DCCI-HOBt [6]; B: H₂-Pd/C; C: HCl in Trifluoräthanol [8]; D: Azidmethode [7].

Die Zwischenprodukte III, IV, VI, VIII, X und XII stellte man nach bekannten Methoden her; Herstellung und Eigenschaften sollen später im Detail beschrieben werden.

Sequenz 25-34 (V). Man verknüpfte die Fragmente III und IV mittels DCCI-HOB^t [6], fällte das Rohprodukt aus Acetonitril-Wasser um (Rf⁴)) (S) = 0,32 (System 100) und entfernte die Z-Gruppe durch katalytische Hydrierung. Dabei wurden gleichzeitig 3 Äq. HCl zugegeben. Man erhielt V als Trihydrochlorid.

Sequenz 18-34 (VII). Kuppeln von V mit dem Fragment 18-24 (VI) mittels DCCI-HOBt gab das Bpoc-Derivat von VII. Dieses reinigte man durch Gegenstromverteilung im System Methanol/0,1 M wässeriges Ammoniumacetat (pH = 7,0)/Chloroform/Tetrachlorkohlenstoff 10:4: 7:3 (K = 0,33), Rf(S) = 0,16 (System 100). Abspalten der Bpoc-Gruppe mittels HCl in Trifluoräthanol⁵) gab das Tetrahydrochlorid VII.

Sequenz 13-34 (IX). VII kondensierte man mit dem nach [7] hergestellten Azid von VIII und reinigte das dabei erhaltene Bpoc-Derivat von IX durch Gegenstromverteilung im System Methanol/0,1M wässeriges Ammoniumacetat (pH = 7,0)/Chloroform/Tetrachlorkohlenstoff 10:3:7:4 (K = 0,65), Rf (S) = 0,40 (System 96); = 0,30 (System 100). Die Bpoc-Gruppe entfernte man wieder mit HCl in Trifluoräthanol und erhielt IX als Pentahydrochlorid, Rf(S) = 0,22 (System 96).

Sequenz 4-34 (XI). Hierauf kuppelte man IX mit der Sequenz 4-12 (X) mittels DCCI-HOBt und reinigte das erhaltene Tritylderivat von XI durch Gegenstromverteilung (System wie bei IX), K = 0.35; Rf (S) = 0.28 (System 100). Man entfernte die Tritylgruppe durch HCl in Trifluoräthanol⁵) zum Hexahydrochlorid XI, Rf (S) = 0.36 (System 96).

Geschützte Sequenz 1-34 (II). XI kuppelte man nach Honzl & Rudinger [7] mit dem aus XII hergestellten Azid und reinigte das Rohprodukt durch Gegenstromverteilung im System Methanol/0,2M wässeriges Ammoniumacetat (pH = 4,75)/Chloroform/Tetrachlorkohlenstoff 10:3:8:4 (K = 0,21); Rf (S) = 0,43 (System 96); = 0,30 (System 100).

I, freies h-PTH-(1-34)-tetratriacontapeptid. Aus II entfernte man die Schutzgruppen durch konz. Salzsäure (10 Min., 0°) und führte das Hydrochlorid von I durch Ionenaustausch in das Acetat über. Das so erhaltene I enthielt nur geringe Mengen von Nebenprodukten, hauptsächlich das Gemisch der Methionin-S-oxid-derivate. Da ein der Formel I entsprechendes Fragment aus natürlichem *h*-PTH bisher nicht her-

⁴⁾ Rf-Werte beziehen sich auf Dünnschichtchromatographien auf Kieselgel (S)- oder Celluloseplatten (C). System 54: 2-Butanol/2-Propanol/9proz. wässerige Chloressigsäure 58:8:34 (v/v); System 96: 2-Butanol/Essigsäure/Wasser 67:10:23; System 100: Essigester/Pyridin/Essigsäure/Wasser 62:21:6:11; System 101: 1-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser 38:24:8:30; System 151: 1-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser 38:20:5:24.

⁵) Über die von uns gefundene Möglichkeit zur bequemen, selektiven Abspaltung säurelabiler Schutzgruppen in diesem Lösungsmittel werden wir in Kürze berichten [8].

gestellt worden ist, konnte das synthetische I nicht mit authentischem Naturprodukt verglichen werden.

Charakterisierung: Rf(C) = 0.36 (System 151); = 0.54 (System 54). Dünnschichtelektrophorese (C), pH = 1,9, 90 Min., 16 V/cm, Laufstrecke 6 cm zur Kathode.

Verteilungskoeffizient K = 0.12 (n-Butanol/0.2M wässeriges Ammoniumacetat (pH = 4.75)/ Methanol 4:4:1).

Aminosäureanalyse (Hydrolyse 15 Std., 118°, 6N HCl) Trp 0,51 (1)⁶); Lys 3,85 (4); His 2,75 (3); Arg 1,88 (2); Asp 3,05 (3); Ser 2,47 (3); Glu 5,06 (5); Gly 1,07 (1); Val 3,16 (3); Met 1,96 (2); Ile 1,03 (1); Leu 4,75 (5); Phe (Bezugswert) 1,00.

Methionin-S-oxid-derivate: a) Gemisch der Met⁹- und Met¹⁸-mono-S-oxide (I in 0,6proz. wässerigem H_2O_2 , 3 Min. 25°) Rf(C) = 0,29 (System 151); = 0,45 (System 101); = 0,48 (System 54).

b) $Met^{8,\bar{1}8}$ -di-S-oxid (I in 0,6proz. wässerigem H_2O_2 , 45 Min., 25°); Rf(C) = 0,21 (System 151); = 0,39 (System 101); = 0,43 (System 54).

Biologische Aktivität⁷). I zeigte in der thyreo-parathyreoidektomierten Ratte, 2 Std. nach intravenöser Injektion, in Dosen von 100 und 500 μ g, eine deutliche Steigerung der Calciumkonzentration im Serum.

Dieses Resultat zeigt, dass trotz der stark verschiedenen Aminosäuresequenz von menschlichem und bovinem PTH, ähnlich wie bei letzterem [9] auch beim menschlichen Hormon ein begrenzter Teil der aminoterminalen Peptidkette zur Ausübung der hormonalen Wirkung genügt.

Für sorgfältige technische Mitarbeit danken wir Frau Y. Rudin, Frau V. von Arx und den Herren W. Beck, U. S. Fritschi, H. R. Keller und A. Stauffer.

Aminosäureanalyse, Dünnschichtchromatographien und Elektrophoresen wurden in verdankenswerter Weise in unserem Chromatographielaboratorium (Leiter: Herr E. von Arx) durch Frl. A. Grosshans und Frl. J. Keller sowie die Herren D. Faupel, A. Linder und W. Morgenthaler, durchgeführt.

LITERATURVERZEICHNIS

- H. B. Brewer, Jr., T. Fairwell, R. Ronan, G. W. Sizemore & C. D. Arnaud, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 69, 3585 (1972).
- [2] H. B. Brewer, Jr. & R. Ronan, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 67, 1862 (1970).
- [3] H. D. Niall, H. Keutmann, R. Sauer, M. Hogan, B. Dawson, G. Aurbach & J. T. Potts, Jr., Z. physiol. Chem. 351, 1586 (1970).
- [4] J. L. H. O'Riordan, J. S. Woodhead, C. J. Robinson, J. A. Parsons, H. Keutmann, H. Niall & J. T. Potts, Jr., Proc. Roy. Soc. Med. 64, 1263 (1971).
- [5] P. Sieber & B. Iselin, Helv. 51, 622 (1968).
- [6] W. König & R. Geiger, Chem. Ber. 103, 788 (1970).
- [7] J. Honzl & J. Rudinger, Coll. Czechoslov. Chem. Commun. 26, 2333 (1961).
- [8] B. Riniker, P. Sieber, B. Kamber & W. Rittel, in Vorbereitung.
- [9] J. T. Potts, Jr., H. T. Keutmann, H. D. Niall, L. J. Deftos, H. B. Brewer, Jr., & G. D. Aurbach, in "Parathyroid Hormone and Thyrocalcitonin", R. V. Talmage & L. F. Belanger, Ed., Excerpta Medica Found., New York 1968, p. 44.
- ⁶) Der Gehalt eines Trp-Restes im unhydrolysierten I ergab sich aus dem UV.-Spektrum $(\lambda_{\max} = 280, 288 \text{ nm}).$
- ⁷) Wir danken Frl. R. Kienzle und Herrn W. Pignat für diese Testierung.