

227. Synthese deuterierter Derivate diastereomerer Cyclopentapeptide für die Konformationsanalyse¹⁾

von Hans Jörg Möschler, Aung Tun-Kyi, Jean-Paul Meraldi,
Kurt Wüthrich und Robert Schwyzer

Institut für Molekularbiologie und Biophysik der
Eidgenössischen Technischen Hochschule, CH-8093 Zürich

(15. VI. 76)

Synthesis of Deuteriated Derivatives of Diastereomeric Cyclopentapeptides for Use in Conformational Analysis. – *Summary.* The syntheses and properties of eight cyclic pentapeptides containing glycine with two deuterium atoms at C(α) (Gly*) are described: *cyclo*-[-Gly-L-Cys(DPM)-Gly-Gly*-L-Pro-], *cyclo*-[-Gly*-L-Cys(DPM)-Gly-Gly*-L-Pro-], *cyclo*-[-Gly-L-Cys(DPM)-Gly-Gly*-D-Pro-], *cyclo*-[-Gly*-L-Cys(DPM)-Gly-Gly*-D-Pro-], *cyclo*-[-Gly-L-Ala-Gly-Gly*-L-Pro-], *cyclo*-[-Gly*-L-Ala-Gly-Gly*-L-Pro-], *cyclo*-[-Gly-L-Ala-Gly-Gly*-D-Pro-], and *cyclo*-[-Gly*-L-Ala-Gly-Gly*-D-Pro-] (DPM = diphenylmethyl). These particular compounds were chosen in order to assign by NMR. unambiguously certain conformational features, like hydrogen-bonding and shielding, to individual peptide bonds.

Gewisse cysteinhaltige Cyclopentapeptide können Kalium- und Rubidium-Ionen binden, vermutlich als sogenannte «Sandwich»-Komplexe, wenn zwei Peptid-Ringe durch eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft werden [1] [2]. Die räumliche Anordnung der Peptidgruppen (C=O nach innen) dürfte für die Komplexbildung eine wesentliche Rolle spielen. Deshalb wurde die Konformation in Lösung einer Reihe solcher Cyclopentapeptide mit Methoden der kernmagnetischen Resonanz und der Berechnung von Energiepotentialen untersucht [3–7].

Erste Vorschläge für die räumliche Anordnung der Atome in den beiden beobachteten Hauptkonformeren [3] [4] beruhten aber auf Experimenten, die noch zu wenig zwischen den drei in den untersuchten Cyclopentapeptiden vorhandenen Glycin-Resten unterscheiden konnten. Erst mit der Einführung von C(α)-dideuterierten Glycinresten (Gly*) wurde die Unsicherheit bezüglich der in Wasserstoffbrücken einbezogenen, bzw. gegen das Lösungsmittel abgeschirmten Peptid-Protonen beseitigt [5–7].

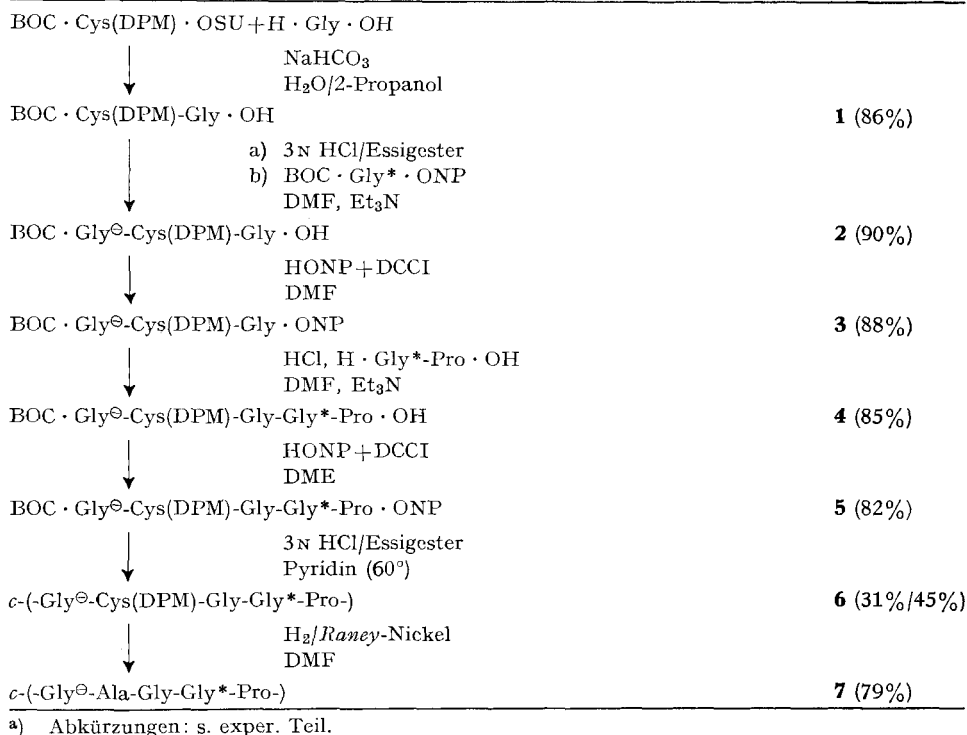
Wir beschreiben hier die Synthese und die Eigenschaften der acht für diese Untersuchungen massgebenden Cyclopentapeptide: *cyclo*-[-Gly-L-Cys(DPM)-Gly-Gly*-L-Pro-], *cyclo*-[-Gly*-L-Cys(DPM)-Gly-Gly*-L-Pro-], *cyclo*-[-Gly-L-Cys(DPM)-Gly-Gly*-D-Pro-], *cyclo*-[-Gly*-L-Cys(DPM)-Gly-Gly*-D-Pro-], *cyclo*-[-Gly-L-Ala-Gly-Gly*-L-Pro-], *cyclo*-[-Gly*-L-Ala-Gly-Gly*-L-Pro-], *cyclo*-[-Gly-L-Ala-Gly-Gly*-D-Pro-] und *cyclo*-[-Gly*-L-Ala-Gly-Gly*-D-Pro-].

Die Synthesen wurden so angelegt, dass sich die deuterierten Glycinreste möglichst spät einführen liessen. Als Schutzgruppen dienten N(α)-*t*-Butoxycarbonyl-(BOC-) und S-Diphenylmethyl-(DPM)-Gruppen; zur Kupplung wurde die Aktivester-

¹⁾ Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der Wissenschaftlichen Forschung für finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Nomenklatur und Abkürzungen entsprechen den in der Peptid- und Proteinchemie üblichen Normen, vgl. E. Wünsch, «Synthese von Peptiden», Bd. 15, Houben-Weyl, «Methoden der organischen Chemie», E. Müller, Herausgeber, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974.

Methode (*p*-Nitrophenylester, *N*-Hydroxysuccinimidester) in Verbindung mit ungeschützten Carboxylkomponenten verwendet (vgl. *Schema*).

Schema. Herstellung von cyclo-Glycyl[⊖]-L-alanyl-glycyl-glycyl*-L-prolyl
(es bedeuten ⊖ = C(α)¹H₂ oder C(α)²H₂ und * = C(α)²H₂)^{a)}



Die Cyclisierungen erfolgten über die *p*-Nitrophenylester der L-Cysteinpeptide in Pyridin bei 60° [8]. Dabei waren die Ausbeuten bei den *D*-Prolinpeptiden signifikant grösser als bei den L-Prolinpeptiden; die Änderung der Werte für die optische Drehung beim Übergang von den offenkettigen zu den cyclischen ist im Fall der (L-Cys, *D*-Pro)-Diastereomeren (+ 19°/+ 20° → + 13°/+ 9°) viel kleiner als bei den L-Cys, L-Pro)-Diastereomeren (- 46°/- 43° → + 11°/+ 6°). ¹³C-NMR.-Messungen zeigten, dass in den offenkettigen Peptiden wie auch im Hauptkonformer der Cyclopeptide die *trans* Gly-Pro-Bindung vorliegt [4-7]. Mit dieser Voraussetzung könnte man die optischen Daten so interpretieren, dass die Konformationen der offenkettigen (L-Cys, *D*-Pro)-Diastereomeren der Konformation der cyclischen viel ähnlicher sind, als diejenigen der (L-Cys, L-Pro)-Diastereomeren.

Die cyclischen L-Alaninpeptide wurden durch Entschwefelung der L-Cysteinpeptide mittels Wasserstoff und Raney-Nickel erhalten. Die NMR.-Spektren zeigten, dass keine Racemisierung am C(α) des Alaninrestes eintritt [6] [7].

Für die linearen Pentapeptide ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede in den Smp. der diastereomeren Produkte, während für die cyclischen Peptide Differenzen von 10 bis 20° gemessen wurden: im Fall der Cysteinpeptide schmolz das *D*-

Prolin-Diastereomere, im Fall der Alaninpeptide jedoch das L-Prolin-Diastereomere höher. Letzteres kristallisierte wasserfrei, das (L-Ala, D-Pro)-Diastereomere mit Wasser. Das (L-Ala, D-Pro)-Diastereomere liess sich jedoch bei 280° im Hochvakuum wasserfrei sublimieren! Im Fall der Cystein-Peptide kristallisierte hingegen das (L-Cys, L-Pro)-Diastereomere mit Wasser, das (L-Cys, D-Pro)-Diastereomere ohne.

Die Konformationsanalyse dieser Verbindungen wird in einer späteren Arbeit eingehend beschrieben [9].

Experimenteller Teil

Allgemeines. Es wurde Glycin-d₂ der Firma *International Chemical & Nuclear Corp.*, Irvine, California (U.S.A.) sowie Glycin-d₅ der Firma *Fluka AG*, Buchs (Schweiz) verwendet. Die Smp. sind unkorrigiert und wurden mit einem Apparat nach Dr. *Tottoli* der Firma *W. Büchi*, Flawil (Schweiz) bestimmt. Für die dünnschichtchromatographische Reinheitskontrolle (DC.) wurden Kieselgelplatten F₂₅₄ der Firma *Merck AG*, Darmstadt (BRD) verwendet. Die Platten wurden mit Jod, Ninhydrin und *Reindel-Hoppe*-Reagens angefärbt. Die optische Drehung wurde mit einem *Perkin-Elmer 141* Polarimeter bestimmt. Die Kernresonanzspektren wurden mit einem *Varian T-60*-NMR.-Spektrometer (Synthesezwischenprodukte) sowie mit einem *Varian HR-220*-NMR.-Spektrometer (cyclische Peptide) aufgenommen. Die Elementaranalysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium (Leitung: *W. Manser*) des Laboratoriums für organische Chemie der ETH-Z ausgeführt. Die gefundenen Werte wurden um den Deuterium-Anteil an den Wasserstoffatomen korrigiert.

Abkürzungen: BOC- *t*-Butoxycarbonyl-, *c*- *cyclo*-, DCCI Dicyclohexylcarbodiimid, DCH N,N'-Dicyclohexylharnstoff, DME 1,2-Dimethoxyäthan, DMF Dimethylformamid, DMSO Dimethylsulfoxid, -DPM Diphenylmethyl-, Et₃N Triäthylamin, HONP *p*-Nitrophenol, -ONP *p*-Nitrophenoxy-, -OSU *N*-Succinimidoxy-, i. V. im Vakuum (ca. 10–20 Torr), i. HV. im «Hochvakuum» (ca. 0,1–0,001 Torr), RT. Raumtemperatur, RV. Rotationsverdampfer (Fa. *Büchi AG*, Flawil, Schweiz).

N-t-Butoxycarbonyl-(S-diphenylmethyl)-L-cysteyl-glycin (1). Eine Lösung von 0,620 g (8,25 mmol) Glycin und 1,260 g (15 mmol) Natriumhydrogencarbonat in 20 ml Wasser wurde unter Rühren mit einer Lösung von 3,635 g (7,5 mmol) *N-t*-Butoxycarbonyl-(*S*-diphenylmethyl)-L-cystein-hydroxysuccinimidester [2] in 40 ml 2-Propanol versetzt. Nach 18 Std. bei RT. wurde alles 2-Propanol bei 40° i. V. verdampft (RT.), die wässrige Lösung verdünnt und mit 2*N* Schwefelsäure auf pH 2 angesäuert. Die mit festem Natriumchlorid ges. Lösung wurde mit Essigester ausgeschüttelt. Die Essigesterlösung wurde 3mal mit Sulfatpuffer [10] sowie 3mal mit wenig Wasser gewaschen und mit ges. Natriumchloridlösung und mit festem Natriumsulfat getrocknet. Nach Verdampfen des Essigesters wurde der Rückstand aus Äther/Petroläther umkristallisiert: 2,85 g (86%) farbloses, amorphes Pulver.

N-t-Butoxycarbonyl-glycyl-(S-diphenylmethyl)-L-cysteyl-glycin (2). Zur Entfernung der *t*-Butoxycarbonylgruppe wurde **1** in HCl/Essigester eingetragen (ca. 3*N*, trocken). Nach 0,5 Std. bei RT. wurde mit viel abs. Äther verdünnt und das ausgefallene Peptid-hydrochlorid abfiltriert, mehrmals mit abs. Äther gewaschen und über NaOH-Plätzchen i. V. einige Std. getrocknet: Ausbeute nahezu quantitativ.

9,525 g (25 mmol) *S*-Diphenylmethyl-L-cysteyl-glycin-hydrochlorid wurden in 50 ml DMF und 7,0 ml (50 mmol) Et₃N mit 8,150 g (27,5 mmol) *N-t*-Butoxycarbonyl-glycin-*p*-nitrophenylester [2] umgesetzt. Nach Reaktion über Nacht bei RT. wurde vom ausgeschiedenen Et₃N-hydrochlorid abfiltriert, das Lösungsmittel bei 40° i. HV. verdampft und der Rückstand in Essigester aufgenommen. Es wurde 3mal mit Sulfatpuffer [10] ausgeschüttelt, mit Wasser neutral gewaschen und mit ges. NaCl-Lösung und festem Natriumsulfat getrocknet. Nach Verdampfen des Essigesters wurde der Rückstand aus Äther/Petroläther umkristallisiert: 11,25 g (90%) weisses, amorphes Pulver.

N-t-Butoxycarbonyl-glycyl-(S-diphenylmethyl)-L-cysteyl-glycin-p-nitrophenylester (3). 3,760 g (7,5 mmol) *N-t*-Butoxycarbonyl-glycyl-(*S*-diphenylmethyl)-L-cysteyl-glycin (**2**) und 1,150 g (8,25 mmol) HONP wurden in 20 ml DMF gelöst, auf 0° gekühlt und mit 1,700 g (8,25 mmol) festem DCCI versetzt. Nach 3 Std. bei 0° und 15 Std. bei RT. wurde das Lösungsmittel i. V. ver-

Tabellc. Charakteristische Eigenschaften der hergestellten Verbindungen mit Glycin-d₂ in Stellung 4 (*)^{a)}

No.	Produkt	e/ ^{b)}	Smp. [°] (unkorr.)	[α] _D ²⁵ in MeOH ^{b)} 10 mg/ml	DC: Rf Sili- cagel	Zusammen- setzung	Molekular- gewicht (Ber.)	Analyse (%)			
								C	¹ H+ ² H	N	S
1	BOC · Cys(DPM)- Gly · OH		109-110	- 21,9	0,32 ^{c)}	C ₂₃ H ₂₈ N ₂ O ₈ S	444,559	62,14	6,34	6,30	7,21
								62,38	6,52	6,06	7,15
2	BOC · Gly-Cys(DPM)- Gly · OH		165-167	- 22,6	0,13 ^{c)}	C ₂₅ H ₃₁ N ₃ O ₆ S	501,611	59,86	6,22	8,37	6,39
								59,48	6,19	8,25	6,62
3	BOC · Gly-Cys(DPM)- Gly · ONP		75- 77	- 14,1	0,59 ^{c)}	C ₃₁ H ₃₄ N ₄ O ₈ S	622,711	59,79	5,50	9,00	5,15
								60,07	5,80	8,57	5,09
4	BOC · Gly [⊖] -Cys(DPM)- Gly-Gly*-Pro [⊕] · OH	C ² H ₂ /L	126-129	- 43,0	0,42 ^{d)}	C ₃₂ H ₃₇ ² H ₄ N ₅ O ₈ S	659,876	58,25	6,87	10,61	4,86
							C ² H ₂ /D	125-127	+ 20,9	0,06 ^{c)}	58,03
5	BOC · Gly [⊖] -Cys(DPM)- Gly-Gly*-Pro [⊕] · ONP	C ¹ H ₂ /L	121-124	- 39,4	0,56 ^{c)}	C ₃₈ H ₄₂ ² H ₂ N ₆ O ₁₀ S	778,873	58,60	5,95	10,79	4,12
							C ¹ H ₂ /D	122-125	+ 36,9	0,12 ^{c)}	58,64
6	c-[Gly [⊖] -Cys(DPM)- Gly-Gly*-Pro [⊕] · ONP]	C ³ H ₂ /L	262-264 ^{e)}	+ 11,3	0,41 ^{d)}	C ₂₇ H ₂₉ ² H ₂ N ₅ O ₅ S · 1 H ₂ O	539,637	58,15	6,32	12,55	5,75
							C ³ H ₂ /D	261-264 ^{e)}	+ 6,4	0,12 ^{c)}	58,49
6	c-[Gly [⊖] -Cys(DPM)- Gly-Gly*-Pro [⊕] · ONP]	C ² H ₂ /D	285-287 ^{e)}	+ 9,3	0,12 ^{c)}	C ₂₇ H ₂₇ ² H ₄ N ₅ O ₅ S · 1 H ₂ O	541,637	57,94	6,66	12,51	5,72
										58,29	6,66
7	c-[Gly [⊖] -Ala-Gly-Gly*- Pro [⊕] · ONP]	C ¹ H ₂ /L	315-320 ^{e)}	+ 5,2	0,24 ^{d)}	C ₁₄ H ₁₉ ² H ₂ N ₅ O ₅	341,353	60,09	6,16	12,97	5,94
							C ² H ₂ /L	318-322 ^{e)}	+ 8,0	0,24 ^{d)}	59,83
7	c-[Gly [⊖] -Ala-Gly-Gly*- Pro [⊕] · ONP]	C ¹ H ₂ /D	305-310 ^{e)}	+ 7,5	0,03 ^{c)}	C ₁₄ H ₁₉ ² H ₂ N ₅ O ₅ · 1 H ₂ O	341,353	49,01	7,42	20,21	19,48
							C ² H ₂ /D	308-313 ^{e)}	+ 10,0	0,03 ^{c)}	46,79
7	c-[Gly [⊖] -Ala-Gly-Gly*- Pro [⊕] · ONP]	C ² H ₂ /D	308-313 ^{e)}	+ 10,0	0,03 ^{c)}	C ₁₄ H ₁₇ ² H ₄ N ₅ O ₅ · 1 H ₂ O	343,353	46,84	6,84	19,31	19,38
										46,60	7,52
7	c-[Gly [⊖] -Ala-Gly-Gly*- Pro [⊕] · ONP]	C ² H ₂ /D	308-313 ^{e)}	+ 10,0	0,03 ^{c)}	C ₁₄ H ₁₇ ² H ₄ N ₅ O ₅ f)	343,353	46,49	7,46	19,01	20,43
										48,20	7,39

a) Das Symbol * bedeutet C(α)²H₂, ⊖ bedeutet C(α)¹H₂ oder C(α)²H₂ und ⊕ steht für D oder L. b) Für Cyclopeptide wurde statt MeOH DMSO verwendet. c) Laufmittel: Chloroform/Methanol/Essigsäure 95:5:3. d) Laufmittel: 1-Butanol/Essigsäure/Wasser 10:1:3. e) Zersetzung. f) Substanz sublimiert i. HV. bei 280°.

dampft, der Rückstand in Essigester aufgenommen und der ausgefallene DCH abfiltriert. Im Filtrat wurde der Essigester i. V. entfernt, und der Rückstand in Äther aufgenommen. Man filtrierte von unlöslichen Nebenprodukten ab und kristallisierte das Produkt durch Zugabe von Petroläther aus: 4,16 g (88%) farbloses Pulver.

N-*t*-Butoxycarbonyl-glycyl-(*S*-diphenylmethyl)-*L*-cysteyl-glycyl-glycyl-*L*-prolin [2]. 1,045 g (5 mmol) Glycyl-*L*-prolin-hydrochlorid [2] und 1,390 ml (10 mmol) Et₃N wurden in 40 ml Dimethylformamid gelöst und mit 3,115 g (5 mmol) **3** umgesetzt. Nach 15 Std. bei RT. filtrierte man vom ausgeschiedenen Et₃N-hydrochlorid ab, verdampfte das Lösungsmittel i.HV. und nahm den Rückstand in Essigester auf. Es wurde 3mal mit Sulfatpuffer [10] ausgeschüttelt mit Wasser, neutral gewaschen und mit ges. NaCl-Lösung und festem Natriumsulfat getrocknet. Nach Eindampfen i. V. kristallisierte man den Rückstand aus Äther/Petroläther: 2,80 g (85%) farbloses, amorphes Pulver.

N-*t*-Butoxycarbonyl-glycyl-(*S*-diphenylmethyl)-*L*-cysteyl-glycyl-glycyl-*L*-prolin-*p*-nitrophenylester (**5**) [2]. 2,290 g (3,5 mmol) **4** und 0,803 g (5,78 mmol) HONP wurden in 20 ml DME gelöst, auf 0° gekühlt und mit 1,191 g (5,78 mmol) DCCI versetzt. Man liess über Nacht im Eisbad reagieren, filtrierte den DCH ab und entfernte das Lösungsmittel i. V. Der Rückstand wurde in Essigester aufgenommen und das Produkt, nach Filtration bei 0°, durch Zugabe von Äther und Petroläther ausgefällt. Umkristallisieren aus demselben System ergab 2,26 g (82%) weisses Pulver.

cyclo-[Glycyl-(*S*-diphenylmethyl)-*L*-cysteyl-glycyl-glycyl-*L*-prolyl] (**6**) [2]. Zur selektiven Abspaltung der BOC-Gruppe wurden 2,00 g (2,58 mmol) des Pentapeptid-*p*-nitrophenylesters **5** in 50 ml *ca.* 3*N* HCl in Essigester eingetragen und während 0,5 Std. reagieren lassen. Die Ausscheidung von *N*-Glycyl-(*S*-diphenylmethyl)-*L*-cysteyl-glycyl-glycyl-*L*-prolin-*p*-nitrophenylester-hydrochlorid wurde durch Zugabe von viel abs. Äther vervollständigt, das Produkt abfiltriert, mit Äther gewaschen und über NaOH-Plätzchen i. V. getrocknet: 1,74 g (95%).

Eine Lösung von 1,500 g (2,1 mmol) *N*-Glycyl-(*S*-diphenylmethyl)-*L*-cysteyl-glycyl-glycyl-*L*-prolin-*p*-nitrophenylester-hydrochlorid in 60 ml DMF wurde im Laufe von 3 bis 4 Std. in 900 ml Pyridin bei 60° eingetroppt (allgemeine Methode von Schwyzer *et al.* [8]) und das Gemisch einige weitere Std. bei 60° gehalten. Das Pyridin wurde i.HV. abgedampft, der Rückstand in 500 ml Chloroform aufgenommen und 4mal mit 0,1*N* HCl sowie ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und darauf mit Wasser neutral gewaschen. Nach Trocknen mit Natriumsulfat und Verdampfen eines grossen Teils des Chloroforms wurde das Produkt durch Zugabe von Äthanol kristallisiert. Umkristallisieren aus demselben Gemisch ergab 0,23 g (20%) eines weissen Pulvers. Das Produkt kann auch aus Äthanol/Wasser umkristallisiert werden.

Bei der Herstellung des diastereomeren Produktes mit *D*-Prolin an Stelle von *L*-Prolin wurden reproduzierbar weit höhere Ausbeuten (31–45%) erzielt.

cyclo-[Glycyl-*L*-alanyl-glycyl-glycyl-*L*-prolyl] (**7**) [4]. 0,100 g (1,86 mmol) **6** wurden in 40 ml trockenem DMF gelöst und mit einer Suspension von *ca.* 1 g Raney-Nickel in DMF versetzt. Das Gemisch wurde 24 Std. bei RT. hydriert, darauf der Nickel abfiltriert und das Lösungsmittel abgedampft. Das Produkt wurde in Äthanol aufgenommen und durch Zugabe von Äther kristallisiert. Umkristallisieren aus Äthanol ergab 0,050 g (79%) reines Produkt (NMR.-Spektren zeigen, dass keine Racemisierung am C(α) des Alaninrestes auftritt).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. Schwyzer, *Experientia* **26**, 577 (1970).
- [2] R. Schwyzer, A. Tun-Kyi, M. Caviezel & P. Mosey, *Helv.* **53**, 15 (1970).
- [3] J. P. Meraldi, R. Schwyzer, A. Tun-Kyi & K. Wüthrich, *Helv.* **55**, 1962 (1972).
- [4] K. Wüthrich, A. Tun-Kyi & R. Schwyzer, *FEBS Letters* **25**, 104 (1972).
- [5] J. P. Meraldi, H. J. Möschler, R. Schwyzer & K. Wüthrich, *J. Physics* **31**, C8–45 (1973).
- [6] J. P. Meraldi, Dissertation Nr. 5283, ETH Zürich 1974.
- [7] H. J. Möschler, Dissertation Nr. 5370, ETH Zürich 1974.
- [8] R. Schwyzer, B. Iselin, W. Rittel & P. Sieber, *Helv.* **39**, 872 (1956).
- [9] J. P. Meraldi, H. J. Möschler, A. Tun-Kyi, R. Schwyzer & K. Wüthrich, *Helv.*, in Vorbereitung.
- [10] P. Spangenberg, P. Tamm & E. Wünsch, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **352**, 655 (1971).