

Synthese eines Tetrapeptids aus der A-Kette des Insulins

Von HELMUT AROLD und MANFRED HARTMANN¹⁾

Inhaltsübersicht

Es wird die Synthese des geschützten Tetrapeptides S-Benzyl-N-carbobenzoxy-L-cysteinyl-L-threonyl-L-seryl-L-isoleucin-methylester nach verschiedenen Methoden beschrieben. Dieses Tetrapeptid entspricht der Aminosäuresequenz 7–10 der A-Kette des Schweine- bzw. Wal-Insulins.

Seit der Aufklärung der vollständigen Struktur des Insulins durch SANGER und Mitarbeiter²⁾ sind zahlreiche Versuche zur Synthese von Teilsequenzen unternommen worden. Unter diesen auch einige, die sich die Darstellung der Teilsequenz 6–11 der A-Kette des Insulins zum Ziel gesetzt haben. Dieser Teil der Insulinstruktur ist deswegen besonders interessant, weil sich innerhalb dieses heterodeten cyclischen Teilpeptids die einzigen bisher beobachteten Unterschiede in der Aminosäuresequenz der Insuline verschiedener natürlicher Herkunft finden.

Über die Synthese der Peptidsequenz 7–11 des Rinder-Insulins berichten MACLAREN et al.³⁾ Auch die Darstellung entsprechender Peptide des Schaf-Insulins ist beschrieben worden. So gelang HOLLAND⁴⁾ die Synthese der Sequenz 7–11 der A-Kette des Insulins unter Benutzung des S-Tetrahydropyran-yl-Derivates des Cysteins. Neuerdings beschreibt KATSOYANNIS⁵⁾ eine Synthese des Peptids 6–9 ebenfalls aus der A-Kette des Schaf-Insulins.

Im folgenden soll über die Synthese des Tetrapeptids L-Cysteinyl-L-threonyl-L-seryl-L-isoleucin berichtet werden, wie es der Sequenz 7–10 der A-Kette des Schweine- bzw. Wal-Insulins entspricht.

¹⁾ Teil der Diplomarbeit MANFRED HARTMANN, Jena 1962.

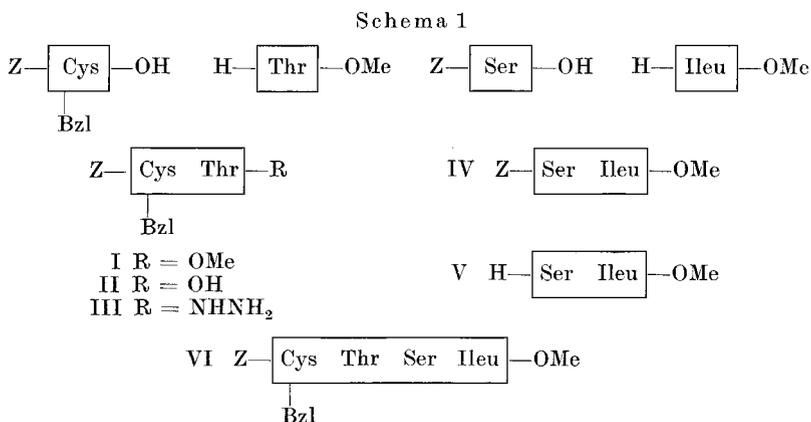
²⁾ H. BROWN, F. SANGER u. R. KITAI, *Biochem. J.* **60**, 556 (1955); F. SANGER u. H. TUPPY, ebenda **49**, 463, 481 (1951); F. SANGER u. E. O. L. THOMPSON, ebenda **53**, 353, 366 (1953); J. I. HARRIS, F. SANGER u. M. A. NAUGHTON, *Arch. Biochem. Biophys.* **65**, 427 (1956).

³⁾ J. A. MACLAREN, W. E. SAVIGE u. J. M. SWAN, *Proc. Intern. Wool Textil Res. Conf. Austr.* **1955**, C. 164; *Chem. Abstr.* **52**, 263 (1958), sowie *Austral. J. Chem.* **11**, 345 (1958).

⁴⁾ G. F. HOLLAND u. L. A. COHEN, *J. Amer. chem. Soc.* **80**, 3765 (1958).

⁵⁾ P. G. KATSOYANNIS, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 4053 (1961).

Der Verlauf der Synthese geht aus dem Schema 1 hervor. Das Dipeptid N-Z-S-bzl-L-cys-L-thr-OMe (I) wird auf zwei verschiedenen Wegen erhalten. Einmal wird N-Z-S-bzl-cystein⁶⁾ mit L-Threoninmethylester⁷⁾ nach der Carbodiimid-Methode⁸⁾ umgesetzt. Auch nach der Cyanmethylester-Methode⁹⁾ läßt sich I aus N-Z-S-bzl-cystein-cyanmethylester¹⁰⁾ und L-Threoninmethylester erhalten, wobei nach dieser Methode bei vergleichbaren Ausbeuten ein leichter zu reinigendes Produkt entsteht. In jedem Falle ist es notwendig, den freien Ester nach HILLMAN¹¹⁾ in Freiheit zu setzen, weil bei Verwendung von Triäthylamin partielle Racemisierung des L-Threonins eintritt¹²⁾ und zu etwa 10% das entsprechende Dipeptid des DL-Threonins erhalten wird, das wir zu Vergleichszwecken ebenfalls hergestellt haben. Aus diesem Dipeptid I wird durch Verseifung mit 1 n KOH die freie Säure (II) und durch Reaktion mit Hydrazinhydrat das Dipeptidhydrazid (III) erhalten.



Das zweite Dipeptid, Z-L-Ser-L-ileu-OMe (IV), läßt sich in guter Ausbeute aus Z-L-Serin¹³⁾ und L-Isoleucinmethylester¹⁴⁾ nach der Carbodiimid-Methode⁸⁾ darstellen. Als Lösungsmittel empfiehlt sich Acetonitril, denn sowohl in Tetrahydrofuran als auch in Dimethylformamid wird die

⁶⁾ C. H. HARRINGTON u. MEAD, *Biochem. J.* **30**, 1598 (1936); B. HEGEDÜS, *Helv. chim. Acta* **31**, 742 (1948).

⁷⁾ K. VOGLER u. P. LANZ, *Helv. chim. Acta* **43**, 270 (1960).

⁸⁾ J. C. SHEEHAN u. G. P. HESS, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 1067 (1955).

⁹⁾ R. SCHWYZER, B. ISELIN u. M. FEURER, *Helv. chim. Acta* **38**, 69 (1955).

¹⁰⁾ B. ISELIN, M. FEURER u. R. SCHWYZER, *Helv. chim. Acta* **38**, 1508 (1955).

¹¹⁾ G. HILLMANN, *Z. Naturforsch.* **1**, 682 (1946).

¹²⁾ H. ZAHN u. H. SCHÜSSLER, *Liebigs Ann. Chem.* **641**, 176 (1961).

¹³⁾ E. BAER u. J. MAURUKAS, *J. Biol. Chem.* **212**, 25 (1955).

¹⁴⁾ R. A. BOISSONAS, S. GUTTMANN, P. JAQUENOUD u. J. WALLER, *Helv. chim. Acta* **38**, 1491 (1955).

Bildung von N-(Z-Seryl-)-N,N'-dicyclohexylharnstoff¹⁵⁾ als Nebenprodukt beobachtet. Nach Abspaltung der Carbobenzoxy-Gruppe mit Pd-Mohr wird der Dipeptidester V in Form des hygroskopischen Hydrochlorids gewonnen, das nicht zur Kristallisation zu bringen war. Da es sich jedoch im Papierchromatogramm als einheitliche Substanz erweist, wird es als Rohprodukt für die Kupplung zum Tetrapeptid eingesetzt.

Die Synthese des Tetrapeptids N-Z-S-bzl-L-Cys-L-Thr-L-Ser-L-Ileu-OMe (VI) erfolgt auf zwei verschiedenen Wegen. Nach der Azid-Methode¹⁶⁾ aus dem Dipeptid-hydrazid (III) und dem Dipeptidester V. Dabei wird in manchen Fällen die Bildung eines in Essigester schwer löslichen Nebenproduktes vom Schmp. 208—210° gefunden, das sich als N-Z-S-bzl-L-Cys-L-Thr-amid erweist. Auch nach der Carbodiimid-Methode⁸⁾ ist das Tetrapeptid (VI) aus Dipeptidsäure II und Ester V erhältlich. Die beiden auf verschiedenen Wegen dargestellten Produkte stimmen innerhalb der Fehlergrenze in ihren spezifischen Drehungen überein. Allerdings wird für das nach der Carbodiimid-Methode dargestellte Produkt ein um etwa 15° niedrigerer Schmp. gefunden. Wir führen dies auf eine Depression infolge geringer Verunreinigung mit Dicyclohexylharnstoff oder auch Acyl-dicyclohexylharnstoff zurück. Papierchromatographisch ist die nach der Azid-Methode gewonnene Verbindung einheitlich.

Die Synthese des Dipeptids N-Z-S-Trityl-L-cysteinyl-S-benzyl-L-cystein-methylester wird N-Z-S-Tri-L-cystein¹⁷⁾ mittels Carbodiimid mit S-Benzyl-L-cystein-methylester¹⁴⁾ umgesetzt. Für das S-Trityl-L-cystein, nach THEODOROPOULOS¹⁸⁾ dargestellt, finden wir allerdings abweichende Konstanten: Schmp. 172—173°, $[\alpha]_D^{20} - 11,5^\circ$ ($c = 2; 0,1 \text{ n NaOH}$); Lit.¹⁹⁾ Schmp. 202—205°, $[\alpha]_D^{20} + 19^\circ$; Lit.¹⁷⁾ Schmp. 181°, $[\alpha]_D^{20} + 14^\circ$; Lit.¹⁸⁾ Schmp. 198—202°, $[\alpha]_D^{20} - 11,3^\circ$. Die Analysenwerte sowie eine Wasserbestimmung unseres Produkts bestätigen das Vorliegen eines Hemihydrates. Das ölige N-Z-S-Tri-L-cystein wird durch Chromatographie an Kieselgel gereinigt und als gut kristallisierendes Dicyclohexylammoniumsalz charakterisiert.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte sind in der offenen Kapillare bestimmt und nicht korrigiert. Die angegebenen R_F -Werte beziehen sich auf das System sek. Butanol/Isopropanol/Monochlor-essigsäure/Wasser (70/10/3g/40) auf Schleicher u. Schüll-Papier 2040 A. Die Fehlergrenze der spez. Drehung beträgt $\pm 1^\circ$. Die Analysensubstanzen wurden bei 0,1 Torr getrocknet.

¹⁵⁾ H. ZAHN u. J. F. DIEHL, Z. Naturforsch. **12b**, 85 (1957).

¹⁶⁾ TH. CURTIUS, Ber. dtsch. chem. Ges. **35**, 3226 (1902).

¹⁷⁾ L. ZERVAS u. I. PHOTAKI, Chimia **14**, 375 (1960).

¹⁸⁾ D. THEODOROPOULOS, Acta Chim. Scand. **13**, 383 (1958).

¹⁹⁾ G. AMIARD, R. HEYMES u. L. VELLUZ, Bull. Soc. chim. France **1956**, 698.

S-Benzyl-N-benzyloxycarbonyl-L-cysteinyl-L-threonin-methylester (I)

a) Carbodiimid-Methode

3,5 g (0,03 Mol) L-Threoninmethylester und 6,0 g S-Benzyl-N-benzyloxycarbonyl-L-cystein werden in 35 cm³ absolutem Methylenchlorid gelöst und bei 0° mit einer Lösung von 4,0 g Dicyclohexylcarbodiimid in 20 cm³ Methylenchlorid versetzt. Nach 48 Stunden im Eisschrank wird vom ausgeschiedenen Harnstoff abgesaugt, mit Methylenchlorid nachgewaschen und das Filtrat im Vakuum bei 35° zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird zur Entfernung überschüssigen Carbodiimids dreimal mit Petroläther verrieben. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen, mit 1 n HCl, Wasser, 1 n NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeengt. Aus Essigester/Hexan kristallisieren 7,0 g (79% d. Th.) vom Schmp. 74–75°. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 37,2^{\circ}$ (c = 2; Methanol).

C₂₃H₂₈N₂O₆S (460,5) ber.: C 59,98; H 6,13; N 6,08;
gef.: C 59,94; H 6,17; N 6,00.

b) Cyanmethylester-Methode

4,96 g (13 mMol) S-Benzyl-N-benzyloxycarbonyl-L-cystein-cyanmethylester werden in 10 cm³ Essigester gelöst, die Lösung von 2,59 g (19 mMol) L-Threoninmethylester zugegeben und nach Zusatz von 0,1 cm³ Eisessig 6 Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird mit 30 cm³ Essigester verdünnt und jeweils zweimal mit 1 n NaHCO₃-Lösung, Wasser, 1 n HCl und Wasser ausgeschüttelt, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum auf 20 cm³ eingeengt. Bei vorsichtigem Zusatz von Hexan werden 4,3 g (72%) Dipeptid in langen Nadeln erhalten. Schmp. 74–75°, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 37,5^{\circ}$ (c = 2; Methanol).

S-Benzyl-N-benzyloxycarbonyl-L-cysteinyl-L-threonin-hydrazid (III)

460 mg (1 mMol) S-Benzyl-N-benzyloxycarbonyl-L-cysteinyl-L-threonin-methylester werden in 2 cm³ Methanol gelöst und 0,6 cm³ Hydrazinhydrat zugegeben. Nach 2 Stunden wird abgesaugt und gründlich mit Äther gewaschen. Der Rückstand ergibt nach Umkristallisation aus 75 cm³ Methanol 410 mg (89% d. Th.) Hydrazid. Schmp. 183–184°. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 17,1^{\circ}$ (c = 2; Dimethylformamid); $-3,2^{\circ}$ (c = 2,15; Eisessig).

C₂₂H₂₈N₄O₅S (460,5) ber.: C 57,39; H 6,09; N 12,17;
gef.: C 57,26; H 6,09; N 11,90.

S-Benzyl-N-benzyloxycarboxyl-L-cysteinyl-L-threonin (II)

230 mg (0,5 mMol) S-Benzyl-N-benzyloxycarbonyl-L-cysteinyl-L-threonin-methylester werden in 2,5 cm³ Aceton gelöst und mit 0,3 cm³ 2 n NaOH 1 Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird mit 40 cm³ Wasser verdünnt und das Aceton im Vakuum abdestilliert. Die wäßrige Lösung wird mit 1 n HCl auf pH 3 gebracht und dreimal mit Essigester extrahiert. Der Extrakt wird über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum das Lösungsmittel abgedampft. Der ölige Rückstand wird beim Anreiben mit Äther/Petroläther fest. Ausbeute 180 mg vom Schmp. 125–128°. Zur Analyse wurde noch zweimal aus Essigester/Hexan kristallisiert. Schmp. 128–129° $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 22,8^{\circ}$ (c = 2; Methanol).

C₂₂H₂₆N₂O₆S (446,5) ber.: C 59,17; H 5,86; N 6,27;
gef.: C 59,16; H 5,91; N 6,69.

S-Benzyl-N-benzyloxycarbonyl-L-cysteinyl-DL-threonin-methylester

Darstellung analog der L-Verbindung (I). Nach der Cyanmethylester-Methode in 60proz. Ausbeute. Nach dem Carbodiimid-Verfahren mit 73% d. Th. Farblose Kristalle aus Essigester/Hexan. Schmp. 104–105°.

$C_{23}H_{28}N_2O_6S$ (460,5) ber.: C 59,98; H 6,13; N 6,08;
gef.: C 59,66; H 5,93; N 5,89.

N-Benzoyloxycarbonyl-L-seryl-L-isoleucin-methylester (IV)

Die Lösungen von L-Isoleucin-methylester (aus 2,16 g = 12 mMol Hydrochlorid nach HILLMANN) in 10 cm³ absolutem Acetonitril und 2,19 g N-Z-L-Serin (9,1 mMol) in 7 cm³ Acetonitril und 5 cm³ Tetrahydrofuran werden bei 0° vereinigt und ohne Rücksicht auf den entstehenden Niederschlag des Salzes der beiden Reaktionspartner eine Lösung von 2,49 g Dicyclohexyl-carbodiimid (12 mMol) in 5 cm³ Acetonitril zugegeben. Die Mischung läßt man zunächst unter häufigem Schütteln 30 Stunden bei 0° und anschließend 30 Stunden bei 30° reagieren. Danach wird vom ausgeschiedenen Harnstoff abgesaugt, mit Acetonitril nachgewaschen und das Filtrat bei 35° im Vakuum zur Trockne gebracht. Der Rückstand wird mehrmals kräftig mit Petroläther durchgerührt, in Essigester aufgenommen, mit 1 n NH₃, 1 n NaHCO₃, Wasser, 1 n HCl, Wasser gewaschen und das Lösungsmittel nach dem Trocknen über Na₂SO₄ im Vakuum abgedampft. Der Rückstand wird in Äther aufgenommen und durch Zugabe von Hexan gefällt. Ausbeute 2,95 g (88%) vom Schmp. 53–56°. Zur Analyse wird noch zweimal aus Äther/Hexan umkristallisiert, 2,6 g (78%) vom Schmp. 54–56°; $[\alpha]_D^{20} - 13,5^\circ$ (c = 2; Methanol).

$C_{18}H_{26}N_2O_6$ (366,4) ber.: C 59,18; H 7,15; N 7,64;
gef.: C 58,78; H 7,00; N 7,58.

L-Seryl-L-isoleucinmethylester-hydrochlorid (V)

733 mg (2 mmol) N-Z-L-Ser-L-Ileu-OMe werden in 40 ml Methanol unter Zusatz von 1 cm³ Eisessig in Gegenwart von 500 mg Pd hydriert. Die Wasserstoffaufnahme ist nach 2 Stunden beendet. Es wird vom Katalysator abdekantiert, mit 5 ml HCl-gesättigtem Methanol versetzt und im Vakuum zur Trockne eingedampft und der glasige Rückstand bei 0,1 Torr über P₂O₅ und festem KOH getrocknet. Ausbeute 520 mg (97%). R_p = 0,74.

S-Benzyl-N-benzyloxycarbonyl-L-cysteinyl-L-threonyl-L-seryl-L-isoleucin-methylester (VI)

a) Azid-Methode

750 mg (1,62 mMol) S-Bzl-N-Z-L-Cys-L-Thr-hydrazid werden in einer Mischung aus 10 cm³ Wasser, 7 cm³ Eisessig und 3,5 cm³ 1 n HCl gelöst, auf –5° abgekühlt und innerhalb 3 Minuten eine vorgekühlte Lösung von 125 mg NaNO₂ in 2 cm³ Wasser tropfenweise unter kräftigem Schütteln zugegeben. Die Mischung wird 3mal mit eiskaltem Essigester ausgeschüttelt, die vereinigten Extrakte mit vorgekühlter 1 n NaHCO₃-Lösung und Wasser neutral gewaschen und im Eisschrank bei –5° über Na₂SO₄ getrocknet. Die filtrierte Lösung wird bei –5° bis –10° mit einer Lösung von L-Ser-L-Ileu-OMe (aus 510 mg Hydrochlorid nach HILLMANN) vereinigt, 5 Stunden bei dieser Temperatur belassen und anschließend 3 Tage bei 0° aufbewahrt. Danach wird mit 1 n NaHCO₃-Lösung, Wasser, 1 n HCl und Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum bei 35° zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen und mit Hexan ausgefällt.

Zur Analyse wird noch zweimal aus Essigester/Hexan umkristallisiert. Ausbeute 460 mg (47%). Schmp. 133–135°; $[\alpha]_D^{20} -13,5^\circ$ ($c = 2,02$; Tetrahydrofuran) $R_F = 0,98^{20}$.

$C_{32}H_{44}N_4O_9S$ (660,8) ber.: C 58,16; H 6,71; N 8,49;
gef.: C 57,96; H 6,59; N 8,49.

b) Carbodiimid-Methode

Zu einer Lösung von 470 mg (1,05 mMol) N-Z-S-Bzl-L-Cys-L-Thr-OH und L-Ser-L-Ileu-OMe, dargestellt aus 375 mg (1,4 mMol) Hydrochlorid (V) nach HILLMANN, in 5 cm³ Acetonitril und 5 cm³ Tetrahydrofuran, wird bei -5° 310 mg (15 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid zugegeben und 48 Stunden bei 0° stehen gelassen. Es wird vom Harnstoff abgesaugt, mit Acetonitril nachgewaschen, das Lösungsmittel im Vakuum bei 35° abgedampft und der Rückstand 3mal mit Hexan gut durchgerührt. Danach wird in Essigester aufgenommen, mit 1 n NaHCO₃-Lösung, Wasser, 1 n HCl und Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Reinigung wie unter a). Ausbeute 300 mg (47%) vom Schmp. 117–120°, $[\alpha]_D^{20} -14,0^\circ$ ($c = 2,04$; Tetrahydrofuran).

N-Benzoyloxycarbonyl-S-trityl-L-cysteindicyclohexylammoniumsalz

Aus einer Lösung des öligen N-Z-S-Tri-L-cysteins¹⁷⁾ in absolutem Äther mit der berechneten Menge Dicyclohexylamin und 24 Stunden Stehen im Eisschrank. Farblose Kristalle, Schmp. 140–142°, $[\alpha]_D^{20} +1,0^\circ$ ($c = 2$; Methanol).

$C_{42}H_{50}N_2O_4S$ (678,9) ber.: C 74,16; H 7,42; N 4,12;
gef.: C 74,33; H 7,32; N 4,09.

N-Benzoyloxycarbonyl-S-trityl-L-cysteinyl-S-benzyl-L-cystein-methylester

Zu einer Lösung von 995 mg (2 mMol) N-Z-S-Tri-L-cystein¹⁷⁾ und S-Bzl-L-cys-OMe (aus 783 mg = 3 mMol Hydrochlorid nach HILLMANN) in 5 cm³ absolutem Methylenchlorid wird bei -5° 580 mg (2,8 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid, gelöst in 3 cm³ Methylenchlorid zugegeben und 48 Stunden im Eisschrank und 12 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Vom Harnstoff wird abgesaugt, mit Methylenchlorid nachgewaschen, das Lösungsmittel im Vakuum bei 35° abgedampft und der ölige Rückstand dreimal mit Hexan gut durchgerührt. Anschließend wird in Essigester aufgenommen, mit 1 n NH₃, 1 n NaHCO₃-Lösung, Wasser, 0,1 n HCl und Wasser ausgeschüttelt und nach dem Trocknen über Na₂SO₄ das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Das Rohprodukt wird aus Essigester/Hexan umkristallisiert. 1,14 g (81%) vom Schmp. 123–127°. Zur Analyse wird noch zweimal aus Essigester/Hexan umkristallisiert. Schmp. 130–132°, $[\alpha]_D^{20} -60,5^\circ$ ($c = 2$; Dimethylformamid).

$C_{41}H_{40}N_2O_5S_2$ (704,9) ber.: C 69,86; H 5,72; N 3,96;
gef.: C 69,76; H 5,67; N 3,74.

²⁰⁾ Entwicklung des Chromatogramms mit Cl₂/Tolidin; J. BARROLLIER, Naturwiss. 48, 554 (1961).

Jena, Institut für Organische Chemie und Biochemie der Friedrich-Schiller-Universität.

Bei der Redaktion eingegangen am 27. Dezember 1962.