

Synthese einer Partialsequenz aus dem aktiven Zentrum der Streptokokken-Protease (EC 3.4.22.10), V

Synthesis of a Fragment of the Active Center of the Streptococcal Proteinase, V

Eugen Schaich und Friedhelm Schneider

Physiologisch-chemisches Institut, Universität Marburg

(Z. Naturforsch. **29 c**, 464–468 [1974]; eingegangen am 22. März 1974)

Streptococcal-Proteinase, Active Center-Peptide, Peptide Synthesis

The synthesis of the protected peptides Boc-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-Gln-Ile-OH and Thr-Ala-Gln-Ile-Met-Lys(Z)-NH₂ is described. These sequences are fragments of an active center peptide of the streptococcal proteinase (EC 3.4.22.10).

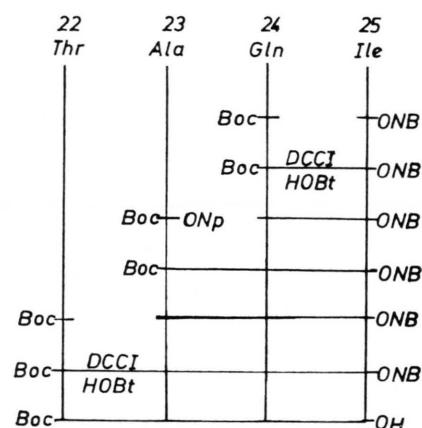
In der vorliegenden Mitteilung berichten wir über die Synthese eines geschützten Hexa- und Okta-peptids aus der carboxylenständigen Region einer Partialsequenz der Streptokokken-Protease¹ (EC 3.4.22.10). Es handelt sich um die Peptide Boc-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-Gln-Ile-OH (Fragment VI) und Thr-Ala-Gln-Ile-Met-Lys(Z)-NH₂ (Fragment VII). Mit diesen Peptiden, die die Aminosäuren 18–25 und 22–27 der aus insgesamt 27 Aminosäuren bestehenden Partialsequenz umfassen², liegen alle Fragmente der Gesamtsequenz vor. Die Endphase der Synthese stellt uns vor die Aufgabe der Verknüpfung der bisher beschriebenen Bruchstücke³; die Hauptschwierigkeiten ergeben sich dabei aus Löslichkeitsproblemen.

Synthese des Fragments VI: Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-Gln-Ile

Die Synthese des aminoendständigen Tetrapeptids Boc-Val-Ala-Thr-Ala wurde bereits in der IV. Mitteilung¹ beschrieben. Für den Aufbau des carboxylenständigen Tetrapeptids Thr-Ala-Gln-Ile gingen wir von Ile-ONB-Tos⁴ aus. Die Kupplung mit Boc-Gln⁵ erfolgte mit DCCI/HOBt. Das nach Abspaltung des Boc-Restes erhaltene Peptid war hygro-skopisch und wurde ohne Umkristallisation weiter verarbeitet, da beim Umkristallisieren teilweise Pyroglutaminsäurebildung eintrat. Die Verlänge-

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. Fr. Schneider, Physiologisch-chemisches Institut der Universität, D-3550 Marburg, Lahmberge.

rung des Peptids erfolgte mit Boc-Ala-ONp⁶ und Boc-Thr⁵/DCCI und verlief ohne besondere Schwierigkeiten (s. Schema I).



SYNTHESE-SCHEMA I.

Aus den beiden Teilstücken 18–21 und 22–25 ließ sich das Oktapeptid Boc-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-Gln-Ile-ONB in guter Ausbeute und Reinheit durch Verknüpfung nach der Carbodiimidmethode unter Zusatz von HOBt gewinnen. Das Produkt ist in DMF schwerlöslich, was bei der hydrogenolytischen Spaltung des Nitrobenzylesters zu Schwierigkeiten führte. Nach 4-tägiger Hydrierung wurde schließlich ein einheitliches Produkt erhalten (s. Schema II).

Abkürzungen: Boc, *tert*-butyloxycarbonyl; DCCI, Dicyclohexylcarbodiimid; DC-Harnstoff, Dicyclohexylharnstoff; DCHA, Dicyclohexylamin; DMF, Dimethylformamid; HMPT, Hexamethylphosphorsäuretriamid; HOBt, 1-Hydroxybenzotriazol; MBzl, *p*-Methoxybenzyl; OMe, Methylester; ONB, *p*-Nitrobenzylester; ONp, *p*-Nitrophenylester; TÄA, Triäthylamin; Z, Benzyloxycarbonyl.

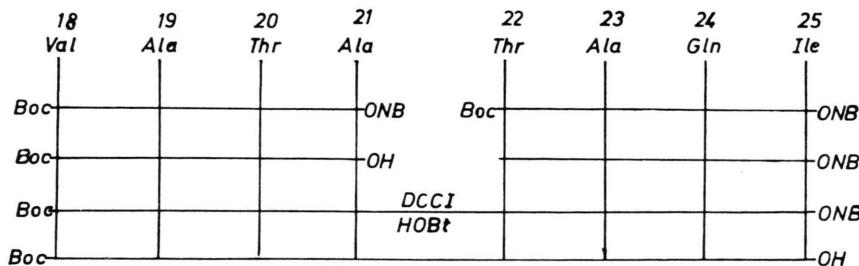


Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.



SYNTHESE-SCHEMA II.

Synthese des Fragments VII:
Thr-Ala-Gln-Ile-Met-Lys

Dieses Hexapeptid wurde aus dem oben beschriebenen geschützten Tetrapeptid (Schema I) und dem Dipeptid Met-Lys(Z)-NH₂ aufgebaut. Das Dipeptid ließ sich mit guter Ausbeute aus Boc-Met-DCHA⁷ und Lys(Z)-OMe x HCl⁸ mit DCCI gewinnen. Bei Verwendung von Boc-Met-ONp waren die Ausbeuten wesentlich schlechter; die Aminolyse zum geschützten Dipeptidamid mit methanol. Ammoniak verlief ohne Komplikationen; Auftreten von Sulfioxid konnte nicht beobachtet werden. Bei der Abspaltung des Boc-Restes mit TFA oder Methylenchlorid/TFA (1:1) trat geringfügige Decarboxylierung an der ϵ -Aminogruppe des Lysins ein. Nach den Stabilitätsprüfungen von Lysinderivaten bei Merrifield-Synthesen⁹ kam dieser Effekt nicht überraschend. Bei Verwendung von wässriger TFA nach Schnabel¹⁰ trat keine Abspaltung des Z-Restes auf. Die Kupplung des Tetrapeptidderivates Boc-Thr-Ala-Gln-Ile mit Met-Lys(Z)-NH₂ mit DCCI/HOBt ergab das schwerlösliche Hexapeptidamid, das das Aminoende 22–27 der Partialsequenz darstellt. Die Verwendung von Boc-Gln(Pmb)¹¹ bei dieser Synthese führte nicht zu einer Verbesserung der Löslichkeitseigenschaften des Endproduktes.

Beschreibung der Versuche

Allgemeines

Ausbeuten beziehen sich, wenn nicht anders vermerkt, auf das gereinigte Produkt mit den angegebenen physikalischen Daten. Schmelzpunkte wurden mit dem Gerät nach Dr. Tottoli (Büchi) bestimmt. Die Werte sind unkorrigiert. Optische Drehungen wurden mit dem Polarimeter 141 (Perkin-Elmer) bestimmt. Elementaranalysen wurden von Frau Dr. A. M. Fretzdorff, Tübingen, Physiologisch-chemi-

sches Institut, sowie im Analytischen Labor Robert Glier, Röthlein üb. Schweinfurt, durchgeführt. Für Dünnschichtchromatogramme wurden mit Kieselgel SIF beschichtete Aluminiumfolien der Firma Riedel de Haen, Hannover, verwendet. Als Laufmittel dienten:

I. *n*-Butanol/Eisessig/Wasser = 4:1:1; II. *n*-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser = 30:20:6:24; III. *n*-Butanol/Eisessig/Methanol/Pyridin/Methylenchlorid/Wasser = 4:1:1:1:2:1; IV. Chloroform/Eisessig = 9:1; V. Chloroform/Cyclohexan/Eisessig = 45:45:10; VI. Diisopropyläther/Chloroform/Eisessig = 6:3:1.

Sprühreagenzien waren Ninhydrin (5-prozentig in Butanol/2 N Essigsäure = 95:5; Chlor-Tolidin¹²; zur Chromatographie wurden schwerlösliche Verbindungen in Trifluoräthanol gelöst. Wegen seiner guten Lösungseigenschaften und seines relativ niedrigen Siedepunktes eignet es sich wesentlich besser zum Auftragen als DMF.

Synthesen

Boc-Gln-Ile-ONB

24,6 g Boc-Gln⁵ (0,1 mol) und 16,5 g HOBt (0,12 mol) in 200 ml DMF wurden bei -5 °C mit 22 g DCCI (0,12 mol) in 50 ml DMF versetzt. Es wurde 1 Stunde lang gerührt, während dieser Zeit fiel DC-Harnstoff aus, man gab eine Suspension von 43,8 g Ile-ONB x Tos⁴ (0,1 mol) in 100 ml DMF und 12 ml N-Methylmorpholin (0,1 mol) hinzu, ließ über Nacht auf Zimmertemperatur kommen, trennte den DC-Harnstoff ab und goß in 1,5 l gesättigte NaCl-Lösung von 0 °C ein. Es setzte sich ein zähes Öl ab, das mit warmem Äthylacetat extrahiert wurde. Nach Trocknen und Einengen kristallisierte das Peptid aus Essigester durch vorsichtige Zugabe von Petroläther.

Ausbeute: 45 g (90%). Schmelzpunkt 132–134 °C. $[\alpha]_D^{24} = -21,8$ (c = 1, Methanol). DC: VI, VII einheitlich.

$C_{23}H_{34}N_4O_8$ (494,6)

Ber. C 55,78 H 6,92 N 11,33,

Gef. C 55,39 H 6,95 N 11,18.

Gln-Ile-ONB x HCl

25 g Boc-Gln-Ile-ONB (0,05 mol) wurden mit 150 ml 4 N HCl/Dioxan übergossen und unter Feuchtigkeitsausschluß und gelegentlichem Umschüttel 1/2 Stunde stehen gelassen. Es wurde eingeengt und der ölige Rückstand mit 500 ml abs. Äther behandelt, wodurch sich ein festes Produkt erhalten ließ. Es wurde abgesaugt, mit abs. Äther gewaschen und sofort über KOH/P₂O₅ 1 Stunde getrocknet (das Produkt war hygroskopisch). Ein Umkristallisierungsversuch aus Wasser führte zu einem Gemisch von Ninhydrin-positivem und -negativem Material, was auf eine teilweise Pyroglutaminsäurebildung zurückzuführen ist.

C₁₈H₂₇ClN₄O₇ (430,5).

Boc-Ala-Gln-Ile-ONB

Das oben erhaltene Gln-Ile-ONB x HCl wurde in 250 ml DMF gelöst, mit 15,5 g Boc-Ala-ONP⁶ (0,05 mol) und bei 0 °C mit 7 ml TÄA (0,05 mol) versetzt. Nach 24 Stunden bei 0 °C und 24 Stunden bei Zimmertemperatur wurde in 1,5 l eiskalte gesättigte NaCl-Lösung eingegossen, wobei sich ein Öl abschied, das nach 2 Stunden fest wurde. Der Überstand wurde 3-mal mit Äthylacetat extrahiert und der fest ausgefallene Anteil damit gelöst. Die vereinigten Essigester-Lösungen wurden mit 5-prozentiger NaHCO₃-Lösung, H₂O und NaCl-Lösung intensiv ausgeschüttelt, getrocknet über Natriumsulfat und eingeengt zu einem Öl. Aus Essigester/Äther/Petroläther erhielt man ein gallertiges Produkt. Es wurde aus Methanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 21 g (74,5%). Schmelzpunkt 150–152 °C. [α]_D²⁴ = -37,6 (c = 1, Methanol). DC: V, VI, VII einheitlich.

C₂₆H₃₉N₅O₉ (565,6)

Ber. C 55,21 H 6,95 N 12,38,
Gef. C 55,43 H 7,04 N 12,60.

Ala-Gln-Ile-ONB x TFA

14 g (0,025 mol) Boc-Ala-Gln-Ile-ONB wurden eine halbe Stunde lang mit Trifluoressigsäure unter Feuchtigkeitsausschluß stehen gelassen. Nach Einengen im Vakuum wurde mit abs. Äther versetzt und gut durchgeknetet. Der Äther wurde dekantiert und der Rückstand aus Methanol vorsichtig mit Äther gefällt. Das Produkt ist gallertig, ließ sich aber gut absaugen.

Ausbeute: 11,8 g (84%). Schmelzpunkt 158–160 °C. [α]_D²⁴ = -15,3 (c = 1, Methanol). C₂₃H₃₂F₃N₅O₉ (579).

Die Abspaltung des Boc-Restes mit 4 N HCl/Dioxan führte zu einem Produkt, das sich durch Verreiben mit Äther zwar in fester Form erhalten ließ, das jedoch nicht umkristallisierbar war.

Boc-Thr-Ala-Gln-Ile-ONB

14,5 g (0,05 mol) Ala-Gln-Ile-ONB x TFA, 10,2 g (0,075 mol) HOBr und 11 g Boc-Thr⁵ (0,05 mol) wurden in 250 ml DMF gelöst, bei -10 °C zuerst mit 6 ml N-Methylmorpholin (0,05 mol) neutralisiert und dann mit 11 g DCCI (0,055 mol) in 50 ml DMF versetzt. Nach Rühren über Nacht, wobei man langsam auf Zimmertemperatur kommen ließ, wurde vom ausgefallenen DC-Harnstoff abgetrennt und die DMF-Lösung in 1200 ml eiskalte Kochsalzlösung eingerührt. Das Peptid fiel als Schmiere aus. Nach Extraktion mit Äthylacetat und dem üblichen Ausschütteln der Lösung wurde erst aus Essigester/Petroläther, dann aus Essigester umkristallisiert.

Ausbeute: 10,8 g (63%). Schmelzpunkt 153–155 °C. [α]_D²⁴ = -41,5 (c = 1, Methanol). DC: I, II, V einheitlich.

C₃₀H₄₆N₆O₁₁ (666,8)

Ber. C 54,04 H 6,96 N 12,60,
Gef. C 54,61 H 7,06 N 12,37.

Thr-Ala-Gln-Ile-ONB x TFA

6,7 g Boc-Thr-Ala-Gln-Ile-ONB wurden wie üblich mit TFA von der Boc-Gruppe befreit. Nach Einengen und Verreiben mit abs. Äther erhielt man ein weißes Pulver.

Ausbeute: 6,7 g (98%). Schmelzpunkt unscharf ab 50–90 °C. [α]_D²⁴ = -29,2 (c = 1, Methanol). DC: I, II, V einheitlich. C₂₇H₃₉F₃N₆O₁₁ (680,6).

Das Produkt wurde ohne Analyse verwendet.

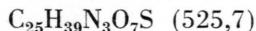
Boc-Thr-Ala-Gln-Ile-OH

6,7 g Boc-Thr-Ala-Gln-Ile-ONB (0,01 mol) wurden in 150 ml Methanol + 1 ml Eisessig mit Pd/Aktivkohle katalytisch hydriert. Nach Filtrieren und Einengen erhielt man ein Öl, das nach intensivem Verreiben mit abs. Äther fest wurde. Das schlecht absaugbare Produkt wurde über P₂O₅ getrocknet. Es war hygroskopisch und wurde ohne Analyse weiterverarbeitet. C₂₃H₄₁N₅O₉ (531,6).

Boc-Met-Lys(Z)-OMe

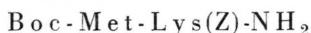
43 g Boc-Met-DCHA⁷ (0,1 mol) und 33 g Lys(Z)-OMe x HCl⁸ (0,1 mol) wurden in 350 ml Methylenchlorid aufgeschlämmt. Bei -5 °C gab man 22 g DCCI (0,11 mol) in 50 ml Methylenchlorid hinzu. Unter Rühren ließ man über Nacht auf Zimmertemperatur kommen. Es wurde abgesaugt, der Niederschlag gut gewaschen und das Filtrat eingeengt. Nach Aufnahme in Essigester filtrierte man noch einmal etwas Harnstoff ab, wusch die Essigester-Lösung wie üblich, trocknete über Na₂SO₄, engte ein und kristallisierte 2-mal aus Äthylacetat/Petroläther um.

Ausbeute: 40 g (76%). Schmelzpunkt 73–75 °C. [α]_D²⁴ = -14,3° (c = 1, Methanol). DC: VI und VII einheitlich.



Ber. C 57,13 H 7,47 N 7,99 S 6,09,
Gef. C 56,84 H 7,51 N 7,84 S 5,95.

Die gleiche Reaktion mit freiem Boc-Met und TÄA als Base führte in gleicher Ausbeute zum gleichen Produkt. Mit Boc-Met-ONp erhielt man nur ca. 50% Ausbeute.

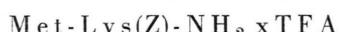


10,5 g Boc-Met-Lys(Z)-OMe (0,02 mol) wurden in 200 ml abs. Methanol gelöst und im Eisbad Ammoniak bis zur Sättigung eingeleitet. Man ließ den verschlossenen Kolben 3 Tage bei Zimmertemperatur stehen, engte ein und kristallisierte aus Äthanol/Petroläther.

Ausbeute: 9,2 g (90%). Schmelzpunkt 147 – 149 °C. $[\alpha]_D^{24} = -18,5^\circ$ (c = 1, Methanol). DC: V, VI und VII einheitlich.



Ber. C 56,42 H 7,50 N 10,97 S 6,28,
Gef. C 56,46 H 7,67 N 10,75 S 6,72.



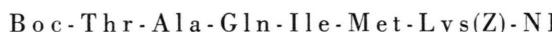
10,2 g Boc-Met-Lys(Z)-NH₂ (0,02 mol) wurden in 40 ml Methylchlorid aufgeschlämmt und mit 40 ml TFA versetzt, nach 20 min wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt, der Rückstand mit abs. Äther versetzt und verrieben. Nach Stehen im Eis wurde der Niederschlag fest. Es wurde 2-mal aus Äthanol/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 9 g (88%). Schmelzpunkt 179 – 180 °C. $[\alpha]_D^{24} = 8,2^\circ$ (c = 1, Methanol). DC: I, II einheitlich.



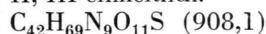
Ber. C 48,08 H 5,94 N 10,67 S 6,11,
Gef. C 48,41 H 6,09 N 10,44 S 6,16.

Erfolgt die Abspaltung mit 70-prozentiger wäßriger Trifluoressigsäure (3 Stunden), so erhielt man sofort ein chromatographisch einheitliches Produkt.

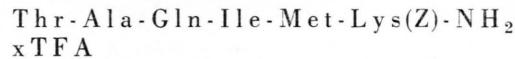


2,66 g (0,005 mol) Boc-Thr-Ala-Gln-Ile und 2,6 g Met-Lys(Z)-NH₂ x TFA (0,005 mol) wurden in 100 ml DMF gelöst unter Zusatz von 1 g HOBT (0,0075). Bei – 5 °C gab man zuerst 0,6 ml N-methylmorpholin (0,005 mol) und dann 1,1 g (0,0055 mol) DCCI in 20 ml DMF hinzu und ließ unter Rühren über Nacht auf Zimmertemperatur kommen. Nach 3 Stunden begann das Produkt und DC-Harnstoff auszufallen. Es wurde abgesaugt und der Rückstand mehrmals mit Propanol ausgekocht.

Ausbeute: 3,5 g (77%). Schmelzpunkt 248 – 250 °C. $[\alpha]_D^{24} = -11,2$ (c = 0,5, DMF). DC: I, II, III einheitlich.

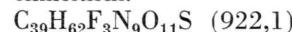


Ber. C 55,55 H 7,66 N 13,88 S 3,53,
Gef. C 56,05 H 7,89 N 13,71 S 3,55.

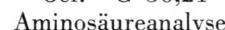


9,1 g Boc-Thr-Ala-Gln-Ile-Met-Lys(Z)-NH₂ (0,01 mol) wurden über Nacht mittels 70-prozentiger wäßriger Trifluoressigsäure deblockiert. Nach Einengen und Versetzen mit Äthanol erhielt man ein weißes Produkt, das in allen geprüften Lösungsmitteln – außer heißem HMPT – sehr schwer löslich ist.

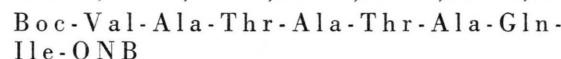
Ausbeute: 9,2 g (100%). Schmelzpunkt 255 °C. $[\alpha]_D^{24} = -8,4^\circ$ (c = 0,5, HMPT). DC: I, II, III einheitlich.



Ber. C 50,80 H 6,77 N 13,67 S 3,48,
Gef. C 50,21 H 6,92 N 13,29 S 3,41.

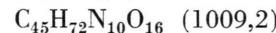


Thr	Ala	Gln	Ile	Met	Lys
Ber.	1	1	1	1	1
Gef.	0,90	1,00	1,00	1,07	0,97

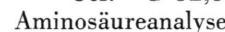


4,6 g Boc-Val-Ala-Thr-Ala-OH (0,01 mol), 6,7 g Thr-Ala-Gln-Ile-ONB x TFA (0,01 mol) und 9,5 g HOBT (0,015 mol) wurden in 150 ml DMF gelöst und bei – 10 °C erst mit 1,2 ml (0,01 mol) N-Methylmorpholin und dann mit 2,2 g DCCI (0,011 mol) in 20 ml DMF versetzt. Unter Rühren ließ man über Nacht auf Zimmertemperatur kommen. Dabei war DC-Harnstoff und Peptid ausgefallen. Nach Absaugen und Waschen mit kaltem DMF, Isopropanol und Wasser wurde 3-mal mit Isopropanol ausgekocht.

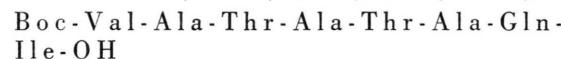
Ausbeute: 7,8 g (78%). Schmelzpunkt 245 °C. $[\alpha]_D^{24} = -15,0$ (c = 0,5, DMF). DC: I, II, III einheitlich.



Ber.	C 53,56	H 7,19	N 13,88,
Gef.	C 52,88	H 7,08	N 13,51.



Val	Ala	Thr	Gln	Ile
Ber.	1	3	2	1
Gef.	0,99	3,10	2,00	1,00



4 g (0,004 mol) Boc-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-Gln-Ile-ONB wurden in 250 ml DMF auf ca. 100 °C erwärmt, bis sich der größte Teil gelöst hatte. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wurde mit PdO₂ als Katalysator hydriert. Das Erwärmen und Abkühlen wurde mehrmals wiederholt bis eine klare Lösung bestehen blieb und kein Wasserstoff mehr aufgenommen wurde. Dann wurde filtriert, im Vakuum eingeeengt und mit Methanol gefällt.

Ausbeute: 3,1 g (86%). Schmelzpunkt 227 – 228 °C. $[\alpha]_D^{24} = -12,4$ (c = 0,5, DMF). DC: I,

II, III, V einheitlich.

$C_{38}H_{67}N_9O_{14}$ (902,2)

Ber. C 50,58 H 7,49 N 13,97,
Gef. C 49,73 H 7,19 N 14,35.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung der Arbeit im Rahmen des Schwerpunktsprogramms „Synthese makromolekularer Naturstoffe“.

¹ IV. Mitteilung dieser Reihe Z. Naturforsch. **29c**, 457 [1974].

² T. Y. Liu, W. H. Stein, S. Moore u. S. D. Elliott, J. Biol. Chem. **240**, 1143 [1965].

³ E. Schaich u. Fr. Schneider, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., im Druck.

⁴ R. H. Mazur u. J. M. Schlatter, J. Org. Chem. **28**, 1025 [1963].

⁵ E. Schnabel, Liebigs Ann. Chem. **702**, 188 [1967].

⁶ K. Hofmann, R. Schmiechen, R. D. Wells, Y. Wolman u. U. Yanaihara, J. Amer. Chem. Soc. **87**, 611 [1965].

⁷ K. Hofmann, W. Haas, M. I. Smithers u. G. Zanetti, J. Amer. Chem. Soc. **87**, 631 [1965].

⁸ R. A. Boissonnas, St. Guttmann, R. L. Huguenin, P. A. Jaquenoud u. E. Sandrin, Helv. Chim. Acta **41**, 1867 [1958].

⁹ E. Schaich u. Fr. Schneider, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **354**, 897 [1973].

¹⁰ E. Schnabel, H. Klostermeyer u. H. Berndt, Liebigs Ann. Chem. **749**, 90 [1971].

¹¹ P. G. Pietta u. G. R. Marshall, Chem. Commun. **1970**, 650.

¹² F. Reindel u. W. Hoppe, Chem. Ber. **87**, 1103 [1954].