

Synthese einer Partialsequenz aus dem aktiven Zentrum der Streptokokken-Proteinase (EC 3.4.22.10), VIII

Synthesis of a Fragment of the Active Center of the Streptococcal Proteinase
(EC 3.4.22.10), VIII

Andreas Raschig, Eugen Schaich und Friedhelm Schneider

Physiologisch-Chemisches Institut, Universität Marburg

(Z. Naturforsch. **30 c**, 752—755 [1975]; eingegangen am 19. August 1975)

Streptococcal Proteinase, Active Center Peptide, Peptide Synthesis

The synthesis of the protected tricosapeptide Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB is described. The tricosapeptide was built up from the decapeptide Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-ONp and the tridecapeptideester Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB. A further nonadecapeptide with *tert*-butylmercapto protection of the SH group was also synthesized.

Durch eine Änderung der Strategie¹ unseres ersten Synthesepans² und Verkürzung der ursprünglich angestrebten Sequenz von 27³ auf 23 Aminosäuren¹ ist es uns gelungen, die enormen Löslichkeitsschwierigkeiten, die sich trotz Variation der Schutzgruppen einer Verknüpfung der die gesamte Partialsequenz umfassenden Fragmente entgegenstellten, zu überwinden und das geschützte Tricosapeptid Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB zu synthetisieren. In der VII. Mitteilung⁴ dieser Reihe wurde der Aufbau der Sequenz 12—23 (s. Schema) behandelt. Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Synthese eines geschützten Tricosapeptids nach dem in Schema 1 angegebenen Synthesepan.

Synthese des Fragments Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala

Der bereits in der VII. Mitteilung⁴ beschriebene Dodecapeptidester Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB wurde zunächst mit Boc-Gln-ONp verlängert; für die Kupplung des Gln als Einzelaminosäure war vor allem unsere frühere Beobachtung⁵ maßgebend, daß eine Verlängerung des Fragments Ala-Ala-Thr-Gly um ein Gln zwar möglich ist, aber der Versuch der Aktivierung auch bei Verwendung von an der Amidgruppe geschützten Gln-Derivaten zu erheblichen Löslichkeitsschwierigkeiten geführt hat. Das gewonnene Tridecapeptid 11—23, das sowohl mit *p*-Methoxybenzyl- als auch mit *tert*-Butylmercapto-Schutz der SH Gruppe

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Val	Lys	Pro	Gly	Glu	Gln	Ser	Phe	Val	Gly	Gln	Ala	Ala	Thr	Gly	His	Cys	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Ala
											Boc					MBzl						ONB
										Boc-ONp						MBzl						ONB
Z	Z			OBzl						OH Boc						MBzl						ONB
Z	Z			OBzl						ONp						MBzl						ONB
Z	Z			OBzl												MBzl						ONB

Syntheschema 1.

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

Abkürzungen: Boc, *tert*-Butyloxycarbonyl; DCCI, Dicyclohexylcarbodiimid; DCH, Dicyclohexylharnstoff; DC, Dünnschichtchromatogramm; DMF, Dimethylformamid;

HBT, 1-Hydroxybenzotriazol; MBzl, *p*-Methoxybenzyl; HMPT, Hexamethylphosphorsäuretriamid; OBzl, Benzylester; ONB, *p*-Nitrobenzylester; ONp, *p*-Nitrophenylester; S-t-Bu, *tert*-Butylmercapto; TAA, Triäthylamin; TFA, Trifluoressigsäure; Zers., Zersetzung.

des Cysteins erhalten wurde, ist ebenfalls sehr schwer löslich in Dimethylformamid, und da es außerdem als Gallerte anfällt, schwer zu reinigen. Von den beiden mit verschiedenen Schwefelschutzgruppen vorliegenden Produkten wurde das besser zu verarbeitende *p*-Methoxybenzyl-geschützte Bruchstück in der üblichen Weise an der Aminogruppe deblockiert und ein Tridecapeptidester erhalten, der noch in DMF (1 g/50 ml) und Hexamethylphosphorsäuretriamid ausreichend löslich war, um als Aminkomponente für weitere Kupplungsreaktionen zu dienen.

Synthese des Fragments Glu-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala

Der oben beschriebene Tridecapeptidester wurde als Aminkomponente mit dem *p*-Nitrophenylester der bereits früher beschriebenen⁶ Acylpeptidsäure Boc-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly zum Nonadecapeptidester gekuppelt. Dieses Fragment war auch nach Deblockierung der Aminogruppe in den gängigen Lösungsmitteln nicht mehr ausreichend löslich und konnte daher nicht als Aminkomponente für eine weitere Verlängerung der Kette eingesetzt werden. Für die Synthese der Sequenz 1–23 blieb daher nur noch die Verknüpfung von 1–10 mit 11–23. Dieser Weg konnte erfolgreich beschritten werden.

Synthese der Sequenz Val-Lys-Pro-Gly-Glu-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala

Wie aus dem Syntheseschema hervorgeht, wurde das geschützte Tricosapeptid aus dem oben beschriebenen Tridecapeptidester als Aminkomponente und dem aktiven Ester des bereits früher beschriebenen⁶ Dekapeptids Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH erhalten. Während die Carboxyl- und Aminkomponente noch eine ausreichende Löslichkeit besaßen (0,7 g/70 ml DMF), war das Reaktionsprodukt selbst in Hexamethylphosphorsäuretriamid kaum noch löslich, konnte aber durch Waschprozeduren mit verschiedenen Lösungsmitteln gereinigt werden und ergab eine gute C,H,N-Analyse sowie eine befriedigende Aminosäureanalyse; die Kupplungsausbeute auf dieser Stufe betrug 70%. Für die Abspaltung der Schutzgruppen kommt schon wegen der Schwerlöslichkeit nur die An-

wendung von Fluorwasserstoff in Frage. Mit diesen Experimenten sind wir zur Zeit beschäftigt. Das nun vorliegende Tricosapeptid unterscheidet sich von der 27 Aminosäuren umfassenden Gesamtsequenz³ durch das Fehlen des Carboxyl-endständigen Tetrapeptids Gln-Ile-Met-Lys. Daher sind unsere weiteren Experimente auf die Synthese der Gesamtsequenz gerichtet. Dabei ist davon auszugehen, daß wir uns in der Endphase der Synthese des Tridecapeptids bereits an mehreren Stellen an der Grenze der Löslichkeit der Fragmente befanden.

Beschreibung der Versuche

Allgemeines s. VI. Mitteilung¹.

Synthesen

Boc-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(S-t-Bu)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

1 mM (1,4 g) Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(S-t-Bu)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB $\times$ 2 TFA⁴ werden zusammen mit 2 mM (0,72 g) Boc-Gln-ONp und 1,1 mM (0,15 g) HBT in 250 ml DMF gelöst und bei 0 °C mit 2 mM (0,28 ml) TAA versetzt. Dabei wird die Lösung sofort trüb, geliert, wird innerhalb von 30 min aber wieder klar. Das Eisbad wird entfernt und der Reaktionsansatz 48 Stunden bei Zimmertemperatur heftig gerührt. Die nun wieder trübe Lösung wird in 1,6 l Eiswasser eingerührt, 12 Stunden im Kühlschrank stehen gelassen und der flockige Niederschlag auf einer Nutsche gesammelt. Der noch feuchte Filterkuchen wird sorgfältig mit Methanol, Äthanol, Essigester und Petroläther nachgewaschen. Das so erhaltene Produkt ist schmierig und glasig und wird über CaCl₂ und P₂O₅ getrocknet. Da das Produkt nur schwer abzusaugen ist und in siedendem DMF nur wenig löslich ist, konnten weitere Reinigungsoperationen nicht durchgeführt werden.

DC: I, II, IV, VI einheitlich.

Ausbeute: 1,1 g (72,4%). Schmelzpunkt: 244 °C (Zers.).

$[\alpha]_D^{24} = -60,6^\circ$ ($c = 1$, HMPT).

C₆₄H₁₀₁N₁₇O₂₂S₂ (1524,73)

Ber. C 50,42 H 6,68 N 15,62

Gef. C 49,48 H 6,66 N 14,83.

Aminosäureanalyse:

	Thr	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	His
Ber.	3,0	1,0	1,0	5,0	1,0	1,0	1,0;
Gef.	2,91	0,96	0,92	5,00	n.b.	1,05	0,99.

*Boc-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB*⁴

1,5 mM (2,15 g) Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB $\times$ 2 TFA⁴ werden zusammen mit 3 mM (1,1 g) Boc-Gln-ONp und 2 mM (0,27 g) HBT in 150 ml DMF gelöst und bei 0 °C mit 3,0 mM (0,42 ml) TAA versetzt. Der trübe und anfangs geleeartige Reaktionsansatz wird aus dem Eisbad entfernt und bei Raumtemperatur 48 Stunden heftig gerührt. Dann wird das Reaktionsgemisch in 1,5 l Essigester eingerührt und nach sechs Stunden Stehen im Kühlschrank das ausgefallene Produkt abfiltriert. Die Reinigung erfolgt durch Waschen mit Äthanol, Äther und Petroläther. Die Löslichkeit in siedendem DMF ist gering.

DC: I, II, IV, VI einheitlich.

Ausbeute: 2,0 g (85,7%). Schmelzpunkt: 238 – 240 °C (Zers.).

$[\alpha]_D^{24} = -22,1^\circ$ ($c = 1$, HMPT).

$C_{68}H_{101}N_{17}O_{23}S$ (1556,71):

Ber. C 52,47 H 6,54 N 15,30;

Gef. C 52,04 H 6,54 N 14,99.

Aminosäureanalyse:

	Thr	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	His
Ber.	3,0	1,0	1,0	5,0	1,0	1,0	1,0;
Gef.	2,90	0,95	0,92	5,00	n.b.	1,03	0,91.

Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB $\times$ 2 TFA

1 mM (1,6 g) des acylierten Tridexapeptids werden wie üblich mit 10 ml TFA behandelt. Die Reinigung erfolgt durch gründliches Waschen mit absolutem Äther.

DC: I, II, IV einheitlich.

Ausbeute: 1,65 g (98%). Schmelzpunkt: 211 – 212 °C (Zers.).

$[\alpha]_D^{24} = -22,7^\circ$ ($c = 1$, HMPT).

$C_{67}H_{95}N_{17}O_{25}SF_6$ (1684,64):

Ber. C 47,77 H 5,68 N 14,13;

Gef. C 47,48 H 5,79 N 13,98.

Boc-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

a. Boc-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-ONp

5 mM (4,3 g) Boc-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-OH⁶ und 7 mM (1,0 g) *p*-Nitrophenol werden in 50 ml DMF gelöst und bei –20 °C mit 0,5 mM (1,13 g) DCCI in 20 ml DMF versetzt. Nach einer halben Stunde wird das Kältebad entfernt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach kurzer Kühlung wird der ausgefallene DCH abfiltriert und das Filtrat in ca. 400 ml Essigester eingerührt. Das

ausgefallene Produkt wird abgesaugt und aus Äthanol umkristallisiert.

DC: I, III minimale Verunreinigung mit Ausgangsprodukt, die auch durch mehrfache Umkristallisation nicht entfernt werden kann.

Ausbeute: 3,2 g (65,5%). Schmelzpunkt: 217 – 227 °C.

$[\alpha]_D^{24} = -16,9^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$C_{47}H_{60}N_8O_{15}$ (977,04):

Ber. N 11,47; Gef. N 11,48.

b. Kupplungsreaktion

0,6 mM (1,0 g) Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys-(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB $\times$ 2 TFA werden in 50 ml DMF gelöst. Anschließend werden 1 mM (1,0 g) Boc-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-ONp und 1 mM (0,14 g) HBT, gelöst in 20 ml DMF, zugegeben. Bei 0 °C werden 1,2 mM (0,17 ml) TAA zur Reaktionslösung getropft. Es bildet sich ein klares Gel, das mit 50 ml DMF verflüssigt wird und 48 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt wird. Der gallertige Ansatz wird in 1,5 l Essigester eingerührt und nach 12 Stunden der weiße Niederschlag abgesaugt und mit Äthanol, Äther und Petroläther nachgewaschen. Das weiße Pulver wird nochmals zur Entfernung von überschüssigem Hexapeptid in 50 ml DMF aufgerührt, bis sich ein klares Gel gebildet hat und die Reinigungsprozedur wiederholt. Dabei fällt das Produkt in reiner Form an. DC: I, II, IV, VI einheitlich.

Ausbeute: 1,0 g (72,5%). Schmelzpunkt: 245 – 246 °C (Zers.).

$[\alpha]_D^{24} = -15,8^\circ$ ($c = 1$, HMPT).

$C_{104}H_{148}N_{24}O_{33}S$ (2294,52):

Ber. C 54,44 H 6,50 N 14,65;

Gef. C 53,97 H 6,41 N 14,37.

Aminosäureanalyse:

Ber.

Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Phe	His
3,0	1,0	3,0	2,0	5,0	1,0	2,0	1,0	1,0;
Gef.								

Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Phe	His
2,91	0,97	3,02	2,00	5,00	n.b.	1,98	0,98	1,01.

Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB $\times$ 2 TFA

0,3 mM (0,7 g) des acylierten Nonadecapeptids werden wie üblich mit 10 ml TFA behandelt. Die Reinigung erfolgt durch gründliches Waschen mit absolutem Äther. Man erhält ein Produkt, das nur schwer in heißem DMF und HMPT löslich ist.

DC: Die Substanz bleibt in allen getesteten Laufmitteln auf der Startlinie liegen.

Ausbeute: 0,7 g (96,3%). Schmelzpunkt: 233 – 234 °C (Zers.).

$[\alpha]_D^{24} = -10,4^\circ$ ($c = 1$, HMPT).

$C_{103}H_{142}N_{24}O_{35}SF_6$ (2422,45):

Ber. C 51,07 H 5,91 N 13,88;

Gef. C 49,47 H 5,69 N 13,16.

Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB

a. *Z-Val-Lys(Z)-Pro-Gly-Glu(OBzl)-Gln-Ser-Phe-Val-Gly-ONP*

2 mm (2,8 g) des Acylpeptids⁶ und 4 mm (0,56 g) *p*-Nitrophenol werden in 50 ml DMF gelöst und bei –20 °C mit 3 mm (0,6 g) DCCI in 20 ml DMF versetzt. Nach einer halben Stunde wird das Kältebad entfernt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach kurzer Kühlung wird der ausgefallene DCH abfiltriert und das Filtrat in ca. 500 ml Essigester eingerührt. Nach weiteren sechs Stunden Kühlung wird der feine, flockige Niederschlag abzentrifugiert und nacheinander je zweimal in Äthanol, Essigester und Äther aufgeschlämmt und abzentrifugiert. Dann wird das Produkt in Petroläther aufgerührt und abfiltriert; man erhält ein lockeres weißes Pulver.

DC: I, VI einheitlich.

Ausbeute: 2,5 g (82%). Schmelzpunkt: 210 – 215 °C (unscharf).

$[\alpha]_D^{24} = -16,6^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$C_{76}H_{95}N_{13}O_{21}$ (1526,66):

Ber. C 59,79 H 6,27 N 11,93;

Gef. C 59,28 H 6,23 N 11,86.

b. Kupplungsreaktion

0,3 mm (0,5 g) *Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys(MBzl)-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-Ala-ONB* × 2 TFA wer-

den in 50 ml DMF gelöst. Dazu gibt man eine Lösung von 0,33 mm (0,5 g) der Carboxylkomponente und 0,35 mm (0,05 g) HBT in 20 ml DMF; bei 0 °C werden 0,6 mm (0,08 ml) TAA zugesetzt. Die gelierende Lösung wird dann 48 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt und in ca. 800 ml Äthanol eingerührt. Nach zweistündigem Rühren unter Kühlung wird der feine, flockige Niederschlag abzentrifugiert, je zweimal in Äthanol, Essigester und Äther aufgeschlämmt, abzentrifugiert und zuletzt in Petroläther aufgerührt und abfiltriert. Das so erhaltene lockere weiße Pulver ist nur noch bedingt in warmem HMPT löslich.

DC: Das Produkt bleibt in allen getesteten Fließmitteln auf der Startlinie liegen.

Ausbeute: 0,6 g (71%). Schmelzpunkt: 241 – 242 °C (Zers.).

$[\alpha]_D^{24} = -23,3^\circ$ ($c = 1$, HMPT).

$C_{133}H_{182}N_{28}O_{39}S$ (2829,14):

Ber. C 56,46 H 6,48 N 13,86;

Gef. C 56,47 H 6,80 N 13,69.

Aminosäureanalyse:

	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val
Ber.	3,0	1,0	3,0	1,0	3,0	5,0	1,0	3,0
	Phe	Lys	His					
	1,0	1,0	1,0;					
	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val
Gef.	3,00	0,98	3,01	0,96	3,00	5,14	n.b.	2,86
	Phe	Lys	His					
	1,05	0,99	1,03.					

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für die Unterstützung der Arbeit.

¹ A. Raschig, Dissertation Marburg 1975 und vorangehende VI. Mitteilung dieser Reihe, Z. Naturforsch. **30 c**, 739 [1975].

² E. Schaich u. Fr. Schneider, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **355**, 939 [1974].

³ T. Y. Liu, W. H. Stein, S. Moore u. S. D. Elliot, J. Biol. Chem. **240**, 1143 [1965].

⁴ A. Raschig u. Fr. Schneider, Z. Naturforsch. **30 c**, 745 [1975].

⁵ E. Schaich, Dissertation Marburg 1973.

⁶ E. Schaich u. Fr. Schneider, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **355**, 945 [1974].