

ERICH WÜNSCH und ANTON ZWICK

Zur Synthese des Glucagons, V¹⁾Darstellung der Sequenz 16—19²⁾Aus dem Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung,
Abteilung für Peptidchemie, München

(Eingegangen am 5. Juni 1964)

Die Synthese von *O*-Benzyl-L-seryl-nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-alaninbenzylester, einer verknüpfungsfähigen Glucagon-Teilsequenz 16—19, wird beschrieben.

Wir hatten beabsichtigt, mit Hilfe des bekannten *N*^α-Benzyloxycarbonyl-Derivats von ω-Nitro-arginin³⁾ die Glucagonsequenz 16—19 als *O*-Benzyl-seryl-nitro-arginyl-nitro-arginyl-alanin-*p*-nitrobenzylester aufzubauen. Die Verknüpfung von Benzyloxycarbonyl-nitro-arginin mit Alanin-*p*-nitrobenzylester nach dem Carbodiimid-Verfahren gelang mit sehr guter Ausbeute; die übliche Spaltung der Urethanschutzgruppe aus dem Acylpeptidester durch Protonensolvolyse führte jedoch nicht zum Erfolg. Das mittels Bromwasserstoff in Eisessig, Dioxan oder Nitromethan erhaltene Nitro-arginyl-alanin-*p*-nitrobenzylester-hydrobromid hielt überschüssigen Bromwasserstoff zäh fest und zeigte in verschiedenen chromatographischen Tests mehrere Nebenprodukte auf⁴⁾. Zahlreiche Reinigungsversuche scheiterten. Eine Abspaltung des Benzyloxycarbonylrestes nach E. TASCHNER und B. LIBEREK⁵⁾ mittels *p*-Toluolsulfonsäure in siedendem Benzol führte zu weitgehender Zersetzung der Nitroguanido-Gruppierung, die sich in einer stürmischen Entwicklung nitroser Gase bemerkbar machte. Auch die WEYGANDSche Trifluoressigsäure-Entacylierung⁶⁾ blieb erfolglos.

Entgegen den Ergebnissen von R. PAUL, G. W. ANDERSON und F. M. CALLAHAN⁷⁾ gelang es uns, Nitro-arginin in hoher Ausbeute in sein BOC-Derivat mittels der SCHWYZERSchen BOC-Technik⁸⁾ überzuführen. Ein von den erstgenannten Autoren beschriebenes, unter Baseneinwirkung durch Cyclisierung entstehendes Diazo-cycloheptan-Derivat⁷⁾ konnten wir nicht nachweisen.

BOC-Nitro-arginin [18] war in beständiger Form nur mit Kristalllösungsmittel (z. B. Wasser bzw. Äthanol) zugänglich; es kam uns für die Anwendung einer Methode des

¹⁾ IV. Mittel.: E. WÜNSCH und A. ZWICK, Chem. Ber. 97, 3305 [1964], vorstehend.

²⁾ Auszugsweise vorgetragen auf dem VI. Europ. Peptidsymposium, Athen, Sept. 1963, E. WÜNSCH, A. ZWICK, G. WENDLBERGER und J. JENTSCH, Pergamon Press, im Druck.

³⁾ M. BERGMANN, L. ZERVAS und H. RINKE, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 224, 40 [1934]; K. HOFMANN, W. D. PECKHAM und A. RHEINER, J. Amer. chem. Soc. 78, 238 [1956].

⁴⁾ Vgl. hierzu F. SCHRÖDER und H. GIBIAN, Liebigs Ann. Chem. 649, 168 [1961]; H. ZAHN und R. FAHNENSTICH, ebenda 663, 184 [1963].

⁵⁾ Collect. czechoslov. chem. Commun. 24, 80 [1959].

⁶⁾ F. WEYGAND und W. STEGLICH, Z. Naturforsch. 14b, 472 [1959].

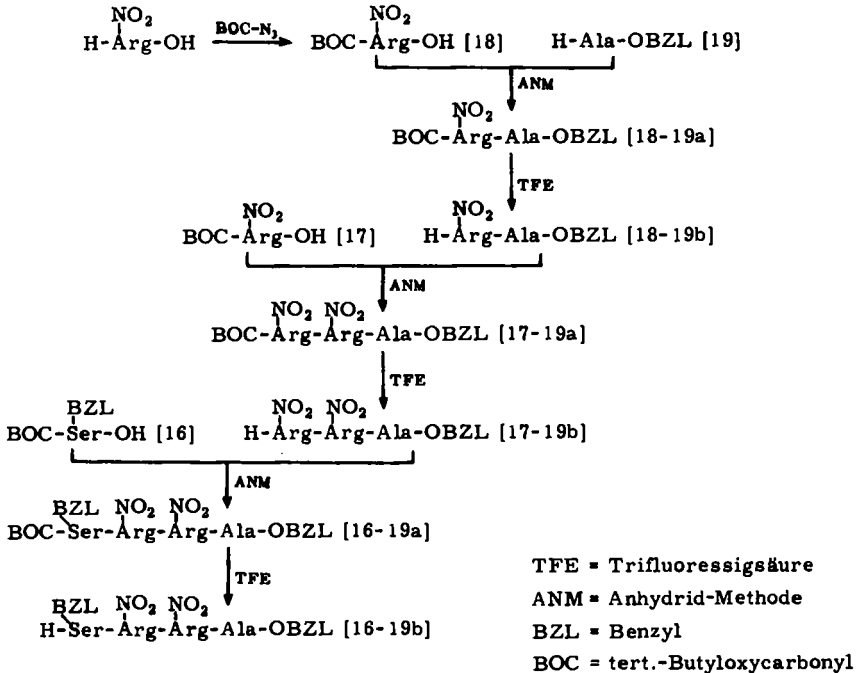
⁷⁾ J. org. Chemistry 26, 3347 [1961].

⁸⁾ R. SCHWYZER, P. SIEBER und H. KAPPELER, Helv. chim. Acta 42, 2622 [1959].

„gemischten Anhydrids“, die bei Acyl-nitro-argininen am wenigsten zum innermolekularen Lactam-Ringschluß führt, sehr zustatten, daß wir das BOC-Derivat mit $\frac{3}{4}$ Mol Tetrahydrofuran kristallisiert erhalten konnten.

Die Verknüpfung des Alkylkohlen säureanhydrids von [18] mit Alanin-benzylester [19]⁹⁾ ergab in 78-proz. Ausbeute BOC-Nitro-arginyl-alanin-benzylester [18-19a]; die Entacylierung mit Trifluoressigsäure verlief eindeutig zum Nitro-arginyl-alanin-benzylester-trifluoacetat [18-19b-Trifluoacetat), das jedoch in analysenreiner Form zusätzlich ca. $\frac{1}{6}$ Mol Trifluoressigsäure einschloß.

Der Anbau eines weiteren Nitro-arginin-Restes zum BOC-Nitro-arginyl-nitro-arginyl-alanin-benzylester [17-19a] nach dem obigen Verfahren gelang eindeutig und in 93-proz. Ausbeute, wenn die Aminokomponente [18-19b] mit 1.17 Moläquiv. Triäthylamin (bez. auf den Trifluoressigsäure-Gehalt) aus dem Salz in Freiheit gesetzt wurde.



Sequenz 16-19

Trifluoressigsäure-Solvolyse des BOC-Tripeptidesters [17-19a] führte zum Nitro-arginyl-nitro-arginyl-alanin-benzylester [17-19b]. In Übereinstimmung mit der oben getroffenen Feststellung konnten wir das Peptid-Derivat als Trifluoacetat + ca. $\frac{1}{3}$ Mol Trifluoressigsäure chromatographisch rein isolieren, d. h. jede Nitroguanido-Gruppierung hatte ca. $\frac{1}{6}$ Mol Trifluoressigsäure gebunden.

⁹⁾ Aus Alanin-benzylester-tosylat oder -hydrochlorid bereitet.

Das Tripeptidderivat [17-19b], aus seinem Salz mit 1.33 Mol Triäthylamin in Freiheit gesetzt, ließ sich mit BOC-*O*-Benzyl-serin [16]¹⁰⁾ nach der Alkylkohlen säureanhydrid-Methode mit 91-proz. Ausbeute zum kristallisierten, chromatographisch wie analytisch reinen BOC-*O*-Benzyl-seryl-nitro-arginyl-nitro-arginyl-alanin-benzylester [16-19a] umsetzen.

Nach erneuter Abspaltung der BOC-Schutzgruppe mittels Trifluoressigsäure konnte letztlich *O*-Benzyl-seryl-nitro-arginyl-nitro-arginyl-alanin-benzylester [16-19b] erhalten werden, ein Derivat der Glucagonsequenz 16—19, das sich für den Aufbau der Sequenz 12—19 durch Verknüpfung mit *N*^α-*Z*-*N*^ε-BOC-Lysyl-tyrosyl-leucyl-asparaginsäure-β-tert.-butylester¹⁾ eignen sollte.

Für die ausgezeichnete technische Mitarbeit sind wir Frau W. VÖLKL und Fräulein U. GRUBER zu Dank verpflichtet.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren im Apparat nach Dr. TOTTOLI bestimmt, die spezif. Drehwerte im lichtelektrischen Polarimeter der Fa. Carl Zeiss ermittelt (Werte der *D*-Linie berechnet).

1. *tert.-Butyloxycarbonyl-nitro-L-arginin* [18]: 67.0 g (ca. 0.3 Mol) *Nitro-arginin* in 300 ccm Dioxan und 300 ccm *n* NaOH werden mit 58.0 g (0.6 Mol) BOC-Azid versetzt, 12 Std. bei 35—40° und nach Zusatz von 5 g MgO weitere 10 Std. bei dieser Temperatur gerührt. Danach filtriert man vom nicht umgesetzten *Nitro-arginin* ab (nach Umkristallisieren aus Wasser werden 16.8 g zurückerhalten), neutralisiert die Lösung mit Citronensäure, entfernt den größten Teil des Dioxans i. Vak. und säuert schließlich nach Abkühlen mit Citronensäure an. Die mit Natriumchlorid gesättigte wädr. Lösung wird mit Essigester erschöpfend extrahiert, die vereinigten Essigesterphasen nach üblicher Aufarbeitung i. Vak. eingedampft. Dabei scheidet sich das BOC-Derivat kristallin ab. Nach scharfem Trocknen i. Vak. über P₂O₅ bei 50° wird der Rückstand in 1000 ccm absol. Tetrahydrofuran heiß gelöst; aus der filtrierten, i. Vak. auf die Hälfte ihres Vol. eingeeengten Lösung kristallisiert BOC-*Nitro-arginin* beim Stehenlassen im Kühlschrank aus. Nadeln vom Schmp. 111—114° (nach Trocknen bei 10⁻³ Torr/Raumtemperatur), [α]_D²⁰: -22.8 ± 0.5° bzw. [α]₅₄₆²⁰: -27.1° (*c* = 1.9, in Pyridin). *R_F* 0.53 (*n*-Amylalkohol/Pyridin/Wasser 35 : 35 : 30). Ausb. 73.0 g (65% d. Th. bzw. 88%, bez. auf umgesetztes *Nitro-arginin*).

C₁₁H₂₁N₅O₆·3/4 C₄H₈O (373.4) Ber. C 45.03 H 7.29 N 18.76 Gef. C 44.90 H 7.41 N 18.65

2. *Spaltung von BOC-Nitro-L-arginin* (hergestellt unter 1.): 1.0 g BOC-*Nitro-arginin* wird mit 3 ccm Trifluoressigsäure übergossen und 2 Std. bei Raumtemperatur aufbewahrt, wobei völlige Lösung eintritt. Nach Abdampfen überschüss. Trifluoressigsäure i. Vak. nimmt man den öligen Rückstand in Wasser auf, stellt mit Ammoniaklösung und Essigsäure auf pH 6.5 und fällt mit heißem absol. Äthanol. Nach mehrstdg. Aufbewahren im Kühlschrank wird abfiltriert und der Rückstand i. Vak. über P₂O₅ getrocknet: Chromatographisch reines *Nitro-arginin*, [α]_D²⁰: +23.1 ± 0.5° bzw. [α]₅₄₆²⁰: +27.9° (*c* = 2, in 2*n* HCl); Ausgangsmaterial [α]_D²⁰: +23.44 ± 0.5° bzw. [α]₅₄₆²⁰: +28.25° (*c* = 2, in 2*n* HCl). Ausb. 650 mg.

3. *tert.-Butyloxycarbonyl-nitro-L-arginyl-L-alanin-benzylester* [18-19a]: Zu 30.4 g (81.5 mMol) BOC-*Nitro-arginin* [18] (mit 3/4 Mol Tetrahydrofuran) und 11.3 ccm Triäthylamin in 400 ccm Tetrahydrofuran werden unter Rühren bei -10° 7.86 ccm Chlorameisensäure-äthyl-

¹⁰⁾ E. WÜNSCH und A. ZWICK, Chem. Ber. 97, 2497 [1964].

ester getropft. 5–10 Min. danach gibt man eine Lösung von 18.0 g (83 mMol) *Alanin-benzylester-HCl*¹¹⁾ und 11.3 ccm Triäthylamin in 100 ccm Chloroform zu, rührt 4 Stdn. bei -10° und weitere 4 Stdn. bei Raumtemperatur. Nach Einengen der Lösung i. Vak. wird der Rückstand zwischen Essigester und verd. Citronensäurelösung verteilt, die abgetrennte organische Phase wie üblich mit Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. auf ein kleines Vol. eingeengt. Auf Zugabe von Äther tritt Kristallisation ein, feine Nadeln vom Schmp. $118.5-120^\circ$, $[\alpha]_D^{20}$: $-26.5 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -32.1° ($c = 1.4$, in Methanol), R_F 0.90 (n-Amylalkohol/Pyridin/Wasser 35 : 35 : 30) bzw. R_F 0.71 (n-Heptan/n-Butanol/Pyridin 2 : 1 : 1), Ausb. 30.5 g (78% d. Th.).

$C_{21}H_{32}N_6O_7$ (480.5) Ber. C 52.49 H 6.71 N 17.49 Gef. C 52.60 H 7.01 N 17.58

4. *Nitro-L-arginyl-L-alanin-benzylester-trifluoacetat* [entspr. 18-19b]: 18.0 g (37.5 mMol) *BOC-Nitro-arginyl-alanin-benzylester* [18-19a] werden mit 30 ccm gekühlter *Trifluoressigsäure* übergossen und 90 Min. bei Raumtemperatur gerührt, wobei völlige Lösung erfolgt. Auf Zugabe von 400 ccm absol. Äther erhält man das *Trifluoacetat* als amorphes Pulver, das nach Auskochen mit absol. Äther i. Vak. bei 10^{-3} Torr/Raumtemperatur über P_2O_5 getrocknet wird. Ausb. 19.3 g (quantitat.; mit $1/6$ Mol TFE).

$C_{18}H_{25}F_3N_6O_7 \cdot 1/6 C_2HF_3O_2$ (513.5) Ber. C 42.89 H 4.83 N 16.37
Gef. C 42.87 H 4.88 N 16.24

5. *tert.-Butyloxycarbonyl-nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-alanin-benzylester* [17-19a]: Zu einem „Anhydrid-Ansatz“ aus 42.5 g (114 mMol) *BOC-Nitro-arginin* [17] (mit $3/4$ Mol Tetrahydrofuran), 15.8 ccm Triäthylamin und 10.9 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* in 700 ccm Tetrahydrofuran (siehe unter 3.) gibt man bei -10° eine Lösung von 59.0 g *Nitro-arginyl-alanin-benzylester-trifluoacetat* (mit $1/6$ Mol Trifluoressigsäure) und 18.6 ccm Triäthylamin in 200 ccm Tetrahydrofuran. Man rührt 3 Stdn. bei -10° und weitere 3 Stdn. bei Raumtemperatur. Nach Einengen der Lösung i. Vak. wird der Rückstand zwischen viel Essigester und verd. Citronensäurelösung verteilt und aufgearbeitet, wie unter 3. beschrieben. Farbloses amorphes Pulver nach Versetzen des Rückstandes mit Äther, Schmp. 125° (unter Erweichen bei 114°), R_F 0.90 (n-Amylalkohol/Pyridin/Wasser 35 : 35 : 30) bzw. R_F 0.74 (n-Heptan/n-Butanol/Pyridin 2 : 1 : 1). Ausb. 72.5 g (93% d. Th.).

$C_{27}H_{43}N_{11}O_{10}$ (681.7) Ber. C 47.57 H 6.36 N 22.60 Gef. C 47.42 H 6.38 N 23.03

6. *Nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-alanin-benzylester-trifluoacetat* [entspr. 17-19b]: 71.2 g (104.5 mMol) *BOC-Nitro-arginyl-nitro-arginyl-alanin-benzylester* [17-19a] werden mit 100 ccm *Trifluoressigsäure* entacyliert, wie unter 4. beschrieben. Farbloses amorphes Pulver, Schmp. 114° , R_F 0.73 (n-Amylalkohol/Pyridin/Wasser 35 : 35 : 30), Ausb. 72.8 g (95%; bez. mit $1/3$ Mol Trifluoressigsäure).

$C_{24}H_{36}F_3N_{11}O_{10} \cdot 1/3 C_2HF_3O_2$ (733.7) Ber. F 10.36 N 21.00 Gef. F 10.48 N 20.84

7. *tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-seryl-nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-alanin-benzylester* [16-19a]: 4.25 g (14.4 mMol) *BOC-O-Benzyl-serin* [16] und 2 ccm Triäthylamin in 50 ccm Tetrahydrofuran werden bei -10° mit 1.39 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* umgesetzt. In das Reaktionsgemisch läßt man eine Lösung von 10.6 g (14.4 mMol) *Nitro-arginyl-nitro-arginyl-alanin-benzylester-trifluoacetat* (mit $1/3$ Mol Trifluoressigsäure) und 2.67 ccm Triäthylamin in 100 ccm Dimethylformamid/Chloroform (1 : 1) unter Rühren einfließen. Nach 4 stdg. Rühren bei -10° und 4 Stdn. bei Raumtemperatur wird i. Vak. eingedampft, der Rückstand in warmem Essigester unter Zusatz von etwas Methanol aufgenommen. Die erhaltene Lösung wird wie üblich gewaschen und getrocknet, wobei durch Zugabe kleiner

¹¹⁾ B. F. ERLANGER und R. M. HALL, J. Amer. chem. Soc. 76, 5781 [1954].

Mengen Methanol für die Erhaltung eines Zweiphasensystems Sorge getragen wird. Eindampfen i. Vak. hinterläßt ein Öl, das beim Behandeln mit Äther erstarrt. Das amorphe Pulver vom Schmp. 105–115° wird in 300 ccm Methanol gelöst und nach Animpfen bei Raumtemperatur der Kristallisation überlassen, feine Nadeln vom Schmp. 173–176°, $[\alpha]_D^{20}$: $-26.8 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -32.6° ($c = 1$, in Pyridin), R_F 0.25 (n-Heptan/n-Butanol/Pyridin 2 : 1 : 1) bzw. R_F 0.77 (n-Amylalkohol/Pyridin/Wasser 35 : 35 : 30), Ausb. 12.1 g (91% d. Th.).

$C_{37}H_{54}N_{12}O_{12}$ (858.9) Ber. C 51.74 H 6.34 N 19.57 Gef. C 51.60 H 6.43 N 19.53

8. *O-Benzyl-L-seryl-nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-alanin-benzylester* [16-19b]: 3.0 g (0.35 mMol) *BOC-Tetrapeptidester* (hergestellt unter 7.) werden mit 5 ccm *Trifluoressigsäure* bei Raumtemperatur innerhalb von 90 Min. entacyliert und aufgearbeitet, wie unter 4. beschrieben. Die über P_2O_5 und Kaliumhydroxyd bei 10^{-2} Torr getrocknete amorphe Fällung in 40 ccm Dioxan/Wasser (7 : 3) wird mit *n* $KHCO_3$ in geringem Überschuß versetzt. Nach Abziehen des Dioxans i. Vak. tritt beim Aufbewahren im Kühlschrank Kristallisation ein. Das abfiltrierte und mit Wasser gewaschene Produkt wird aus 80-proz. Äthanol umkristallisiert, Schmp. 175–178° (Zers.), $[\alpha]_D^{20}$: $-7.6 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -9.6° ($c = 1$, in Eisessig), Ausb. 2.82 g (86% d. Th.).

$C_{32}H_{46}N_{12}O_{10} \cdot 1/4 H_2O$ (763.3) Ber. C 50.35 H 6.14 N 22.02
Gef. C 50.34 H 6.10 N 21.85