

ERICH WÜNSCH

Zur Synthese des Glucagons, VI¹⁾**Darstellung der Sequenz 20–23**Aus dem Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung,
Abteilung für Peptidchemie, München

(Eingegangen am 2. September 1964)

Die Synthese von Trifluoracetyl-L-glutaminyll-asparagyl(β -tert.-butylester)-L-phenylalanyl-L-valin-hydrazid, einem „verknüpfungsbereiten“ Derivat der Glucagonsequenz 20–23, wird beschrieben.

In den vorausgegangenen Mitteilungen I bis V haben wir die Darstellung von Derivaten der Glucagonsequenzen 1–4, 5–8, 9–11, 12–15 und 16–19 beschrieben. In dieser und der folgenden Arbeit soll über die Synthese von Derivaten der Sequenz 20–23 bzw. 24–29 berichtet werden, mit deren Hilfe der Aufbau eines „verknüpfungsfähigen“ Teilstücks des Glucagons (Sequenz 20–29) möglich sein könnte.

Asparaginsäure- α -methylester- β -tert.-butylester [21]²⁾ ließ sich mit Benzyloxycarbonyl-glutamin [20]³⁾ nach dem Carbodiimid-Verfahren zum Acylpeptidester [20-21 a] umsetzen, aus dem nach alkalischer Esterhydrolyse (Acylpeptid [20-21 b]) und hydrogenolytischer Spaltung der Benzylurethan-Schutzgruppe Glutaminyll-asparaginsäure- β -tert.-butylester [20-21 c] resultierte. Daraus konnte nach SCHALLENBERG-CALVIN⁴⁾ mittels Trifluoräthylsäure-S-äthylester das Trifluoracetylpeptid [20-21 d] erhalten werden.

Gleichfalls nach der Carbodiimid-Methode ließ sich BOC-Phenylalanyl-valin-benzyloxycarbonylhydrazid [22-23 a] aus den beiden Komponenten BOC-Phenylalanin [22]⁵⁾ und Valin-benzyloxycarbonylhydrazid [23 c] synthetisieren. Zur Darstellung des letzteren wurde BOC-Valin [23 a]⁶⁾ mit Benzyloxycarbonylhydrazin (leicht zugänglich aus Chlorameisensäure-benzylester und Hydrazinhydrat, siehe Versuchsteil) zum disubstituierten Valinderivat [23 b] umgesetzt und dieses mit Chlorwasserstoff in Essigester zum Valin-benzyloxycarbonylhydrazid-hydrochlorid [23 c-Hydrochlorid] entacyliert; Trifluoressigsäure ergab hierbei eine geringere Ausbeute. Die Abspaltung des BOC-Restes aus dem BOC-Derivat [22-23 a] mit Halogenwasserstoff gelang zu über 90%.

1) V. Mittel.: E. WÜNSCH und A. ZWICK, Chem. Ber. 97, 3312 [1964].

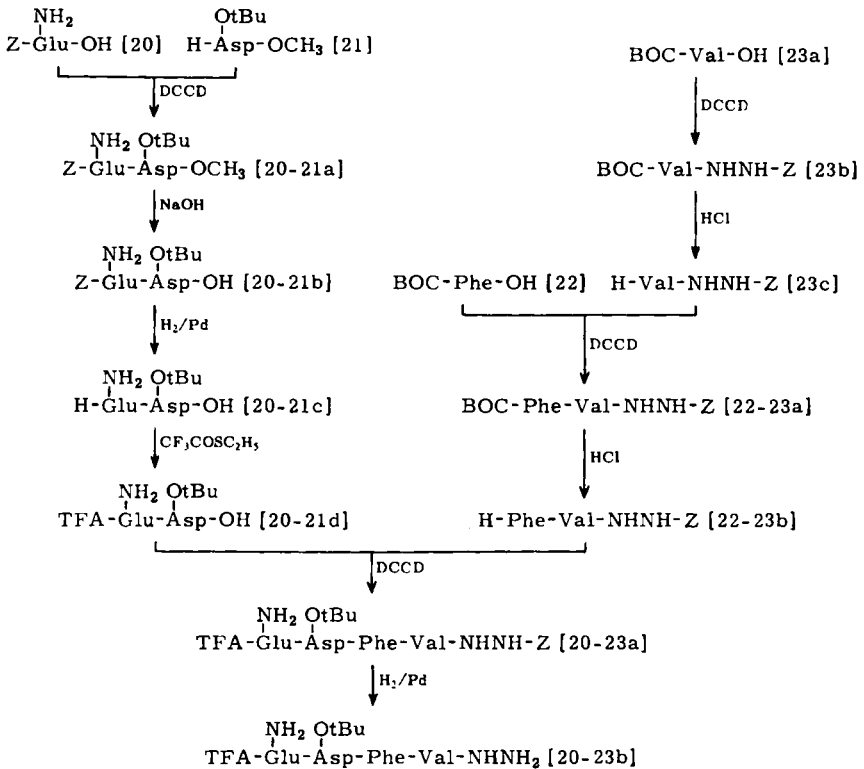
2) E. WÜNSCH und A. ZWICK, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 333, 108 [1963].

3) M. BERGMANN und L. ZERVAS, Chem. Ber. 65, 1192 [1932]; L. LEVINTOW, I. R. GREENSTEIN und R. B. KINGSLEY, Arch. Biochem. Biophysics 31, 77 [1951]; R. A. BOISSONNAS, S. GUTTMANN, R.-A. JAQUENOUD und J. P. WALLER, Helv. chim. Acta 38, 1491 [1955].

4) E. E. SCHALLENBERG und M. CALVIN, J. Amer. chem. Soc. 77, 2779 [1955].

5) E. WÜNSCH, G. WENDLBERGER und J. JENTSCH, Chem. Ber. 97, 3298 [1964].

6) R. SCHWYZER, P. SIEBER und H. KAPPELER, Helv. chim. Acta 42, 2622 [1959]; G. W. ANDERSON und A. G. MCGREGOR, J. Amer. chem. Soc. 79, 6180 [1957].



Z = Benzyloxycarbonyl
BOC = tert.-Butyloxycarbonyl

DCCD = Dicyclohexylcarbodiimid
TFA = Trifluoracetyl

Die Carbodiimid-Verknüpfung bei -10° von Trifluoracetyl-glutaminy-l-asparaginsäure- β -tert.-butylester [20-21 d] und freiem Phenylalanyl-valin-benzyloxycarbonylhydrazid [22-23 b] — bereitet aus dem Hydrochlorid — führte in ca. 55-proz. Ausbeute zum Tetrapeptid-Derivat [20-23 a], das fast quantitativ zum Trifluoracetyl-glutaminy-l-asparagyl(β -tert.-butylester)-phenylalanyl-valin-hydrazid [20-23 b] katalytisch hydriert werden konnte.

Vorliegende und folgende Arbeit über Glucagonsequenzen wurden wiederum durch umfangreiche Unterstützungen der FARBENFABRIKEN BAYER AG und der FARBWERKE HOECHST AG ermöglicht. Ich bin beiden Firmen zu hohem Dank verpflichtet.

Herrn A. UHLEMAYR danke ich für die sorgfältige Durchführung der präparativen Arbeiten.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Unter experimenteller Mitarbeit von Herrn A. VOLK, Farbwerke Hoechst AG, Pharma-Forschung, Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. SIEDEL

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

1. *Benzoyloxycarbonyl-L-glutaminyll-L-asparaginsäure- α -methylester- β -tert.-butylester [20-21a]*: 61.7 g *Z-Glutamin* [20] in 200 ccm Dimethylformamid werden bei -15° mit 27.8 ccm Triäthylamin und einer Aufschlammung von 48.0 g (0.20 Mol) *Asparaginsäure- α -methylester- β -tert.-butylester-hydrochlorid* [21-Hydrochlorid] in Acetonitril unter Rühren versetzt. Dazu gibt man 41.2 g *Dicyclohexylcarbodiimid* in Acetonitril/Dimethylformamid und rührt 2 Stdn. bei -10° und weitere 3 Stdn. bei Raumtemp. Nach Abkühlen auf -10° wird vom Harnstoff und dem größten Teil Triäthylaminhydrochlorid abfiltriert und das Filtrat i. Vak. zur Trockne gebracht. Der Rückstand kristallisiert nach Aufnehmen in heißem Äthanol beim Stehenlassen im Kühlschrank. Aus Äthanol Schmp. $154-156^{\circ}$, $[\alpha]_{D}^{20}$: $+3.7 \pm 0.5^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $+4.2^{\circ}$ ($c = 1.3$, in 80-proz. Essigsäure). Ausb. 73.7 g (79.4%).

$C_{22}H_{31}N_3O_8$ (465.5) Ber. C 56.76 H 6.71 N 9.02 Gef. C 56.50 H 6.62 N 9.31

2. *Benzoyloxycarbonyl-L-glutaminyll-L-asparaginsäure- β -tert.-butylester [20-21b]*: 22 g *Benzoyloxycarbonyl-glutaminyll-asparaginsäure- α -methylester- β -tert.-butylester* [20-21a], in 200 ccm Methanol/Dioxan (1:1) suspendiert, werden unter Rühren langsam mit 50 ccm 1*n* NaOH versetzt. Nach 30 Min. wird das Filtrat mit 25 ccm 2*n* HCl neutralisiert und i. Vak. auf ca. 75 ccm eingengt. Man läßt über Nacht im Kühlschrank kristallisieren. Der Niederschlag wird abfiltriert, nach Verreiben in einer Reibschale mehrmals mit kleinen Portionen Wasser digeriert und i. Vak. getrocknet. Aus absol. Äthanol farblose Kristalle, Schmp. (158) 160° (Zers.). Ausb. 15.8 g (74.2%).

$C_{21}H_{29}N_3O_8$ (451.5) Ber. C 55.86 H 6.47 N 9.31 Gef. C 55.7 H 6.7 N 9.7

3. *L-Glutaminyll-L-asparaginsäure- β -tert.-butylester [20-21c]*: 15.0 g *Benzoyloxycarbonyl-glutaminyll-asparaginsäure- β -tert.-butylester* [20-21b] in 350 ccm Methanol/Dimethylformamid/Wasser (3:2:2) werden in Gegenwart von Pd-Schwarz hydriert (Vibromischer). Nach 30 Min. beginnt das Reduktionsprodukt auszukristallisieren, nach ca. 2 Stdn. ist die CO_2 -Abspaltung beendet. Der dicke Brei wird abfiltriert und noch feucht mit 200 ccm Wasser auf dem Dampfbad zur Lösung erhitzt. Darauf wird heiß vom Katalysator abfiltriert und das Filtrat i. Vak. zur Trockne gebracht. Nach Zusatz von 50 ccm absol. Äthanol läßt man über Nacht im Kühlschrank stehen, filtriert das farblose Kristallisat ab und trocknet über P_2O_5 i. Vak.; Schmp. $180-181^{\circ}$ (Zers.), $[\alpha]_{D}^{20}$: $+25.0 \pm 0.8^{\circ}$ ($c = 1$, in n CH_3CO_2H). Ausb. 8.84 g (83%).

$C_{13}H_{23}N_3O_6$ (317.3) Ber. C 49.20 H 7.31 N 13.24 Gef. C 48.9 H 7.3 N 13.1

4. *Trifluoracetyl-L-glutaminyll-L-asparaginsäure- β -tert.-butylester [20-21d]*: 8.50 g *Glutaminyll-asparaginsäure- β -tert.-butylester* [20-21c] in 27.0 ccm *n* NaOH werden mit 6.8 g *Trifluor-thioessigsäure-S-äthylester* („SCHALLENBERG-Reagenz“) 7 Stdn. geschüttelt. Nach Zugabe von 13.5 ccm 2*n* HCl läßt man die Mischung über Nacht im Kühlschrank stehen. Das entstandene Kristallisat wird abfiltriert, über P_2O_5 bei 0.05 Torr getrocknet und mit 80 ccm siedendem absol. Äthanol behandelt, wobei weitgehend Lösung erfolgt. Das Filtrat wird i. Vak. auf ca. 20 ccm konzentriert und mit 240 ccm Petroläther versetzt. Nach 3 Stdn. im

Kühlschrank wird das gebildete Kristallinat abfiltriert, über P_2O_5 bei 0.01 Torr getrocknet und aus absol. Äthanol/Äther/Petroläther umkristallisiert, Schmp. 170° (Zers.). Ausb. 7.18 g (68%).

$C_{14}H_{22}F_3N_3O_7$ (401.3) Ber. C 41.89 H 5.53 N 10.47 Gef. C 41.8 H 5.5 N 10.1

5. *tert.-Butyloxycarbonyl-L-valin-benzyloxycarbonylhydrazid* [23b]: 16.9 g *BOC-Valin* [23a] in 85 ccm Tetrahydrofuran werden mit 13.0 g *Benzyloxycarbonylhydrazin* in 45 ccm Acetonitril vereinigt, und die Mischung bei -20° unter Rühren mit 16.0 g *Dicyclohexylcarbodiimid* in 60 ccm Tetrahydrofuran versetzt. Nach 2 Stdn. Rühren bei -20° und 48 Stdn. Aufbewahren im Kühlschrank wird vom Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, das Filtrat i. Vak. eingedampft, der ölige Rückstand in 200 ccm Essigester aufgenommen und wie üblich bei 0° mit Citronensäure-, Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wird der verbleibende zähe Sirup mit 100 ccm Petroläther verrieben und die einsetzende Kristallisation über Nacht im Kühlschrank vervollständigt. Der farblose Niederschlag wird abfiltriert, mit wenig Wasser gewaschen und über P_2O_5 bei 0.05 Torr getrocknet, Schmp. $94-100^\circ$ (zur Weiterverarbeitung genügend rein). Ausb. 21.7 g (76.3%). (Nach verlustreichem Umkristallisieren aus 50-proz. Äthanol Schmp. 109° .)

$C_{18}H_{27}N_3O_5$ (365.4) Ber. C 59.16 H 7.45 Gef. C 58.9 H 7.6

6. *L-Valin-benzyloxycarbonylhydrazid-trifluoacetat* [23c-Trifluoacetat]: 6.73 g *tert.-Butyloxycarbonyl-valin-benzyloxycarbonylhydrazid* [23b] (Schmp. $94-100^\circ$) werden mit 25 ccm *Trifluoressigsäure* behandelt und die klare Lösung wird nach 10 Min. mit 150 ccm absol. Äther versetzt. Nach kurzem Stehenlassen bei 0° werden die ausgeschiedenen Kristalle abgesaugt, mit Äther gewaschen und über P_2O_5 bei $60^\circ/0.01$ Torr getrocknet; Schmp. 196 bis 197° , Ausb. 4.95 g (70.7%).

$C_{13}H_{20}N_3O_3 \cdot C_2O_2F_3$ (379.3) Ber. C 47.52 H 5.31 N 11.08 Gef. C 47.9 H 5.7 N 11.1

7. *L-Valin-benzyloxycarbonylhydrazid-hydrochlorid* [23c-Hydrochlorid]: 40 g *tert.-Butyloxycarbonyl-valin-benzyloxycarbonylhydrazid* [23b] (Schmp. $94-100^\circ$) werden in 400 ccm *n* HCl/Essigester gelöst und bei Raumtemperatur 2 Stdn. gerührt. Die in der Zwischenzeit einsetzende Kristallisation wird durch mehrstdg. Stehenlassen im Kühlschrank vervollständigt. Das Kristallinat wird abgesaugt, mit Essigester und absol. Äther gewaschen und über P_2O_5 bei 0.05 Torr getrocknet; Schmp. $102-110^\circ$ (Zers.), $[\alpha]_D^{25}$: $+18.5 \pm 0.8^\circ$ ($c = 2$, in Wasser). Ausb. 27.9 g (84.6%).

$C_{13}H_{20}N_3O_3 \cdot Cl \cdot H_2O$ (319.8) Ber. C 48.82 H 6.61 N 13.14 $1H_2O$ 5.6
Gef. C 48.9 H 7.1 N 13.6 H_2O 4.6 (nach FISCHER)

8. *tert.-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-valin-benzyloxycarbonylhydrazid* [22-23a]: 25.8 g *Valin-benzyloxycarbonylhydrazid-hydrochlorid* in 100 ccm Dimethylformamid werden bei -5° mit 12.0 ccm *Triäthylamin* tropfenweise versetzt und 10 Min. bei -2° gerührt. Das ausgeschiedene Triäthylaminhydrochlorid wird abgesaugt und mit 20 ccm Dimethylformamid gewaschen. Nach Zugabe von 25.0 g *BOC-Phenylalanin* [22] in 50 ccm Dimethylformamid wird auf -20° gekühlt, eine Lösung von 17.3 g *Dicyclohexylcarbodiimid* in 50 ccm Acetonitril zugesetzt, 3 Stdn. bei -15° gerührt und über Nacht im Kühlschrank stengelassen. Nach 3 Stdn. bei Raumtemperatur filtriert man ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab, dampft das Filtrat i. Vak. ein und nimmt den sirupösen Rückstand in 250 ccm Essigester auf. Die erhaltene Lösung wird wie üblich mit verd. Citronensäure-, Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser rasch gewaschen. Hierbei scheidet sich ein Teil des Dipeptids aus; es wird abfiltriert (1. Frakt.), die Essigesterlösung i. Vak. eingedampft, mit Petroläther versetzt

und nach Animpfen mit oben erhaltenen Kristallen über Nacht im Kühlschrank stehen gelassen (2. Frakt.). Aus Essigester/Petroläther Schmp. 167°. Ausb. 32.7 g (79%).

$C_{27}H_{36}N_4O_6$ (512.6) Ber. C 63.26 H 7.08 N 10.93 Gef. C 63.5 H 7.4 N 11.2

9. *L*-Phenylalanyl-*L*-valin-benzyloxycarbonylhydrazid-hydrochlorid [22-23b-Hydrochlorid]: 20.48 g (40 mMol) *tert*.-Butyloxycarbonyl-phenylalanyl-valin-benzyloxycarbonylhydrazid [22-23a] werden in 240 ccm *n* HCl/Essigester suspendiert und 45 Min. bei 40° gerührt. Die gebildete dicke Gallerte wird mit 500 ccm absol. Äther behandelt, abfiltriert, mit absol. Äther gewaschen und über P_2O_5 bei 0.03 Torr getrocknet.

Das erhaltene Rohprodukt löst man in 80 ccm siedendem Methanol, filtriert heiß und versetzt das Filtrat mit 150 ccm absol. Äther. Nach mehreren Stdn. im Kühlschrank werden die farblosen, derben Nadeln abfiltriert und über P_2O_5 i. Vak. getrocknet; Schmp. 221° (Zers.), $[\alpha]_D^{25}$: $-18.3 \pm 0.5^\circ$ ($c = 2$, in Wasser). Ausb. 16.22 g (90.5%).

$C_{22}H_{29}N_4O_4Cl$ (448.9) Ber. C 58.85 H 6.51 N 12.48 Gef. C 58.6 H 6.7 N 12.8

10. *Trifluoracetyl-L-glutaminyll-L-asparagyl*(β -*tert*.-butylester)-*L*-phenylalanyl-*L*-valin-benzyloxycarbonylhydrazid [20-23a]: 10.0 g *Phenylalanyl-valin-benzyloxycarbonylhydrazid-hydrochlorid* (hergestellt unter 9.) in 200 ccm absol. Methanol werden bei 0° 2.8 ccm *Triäthylamin* zugesetzt. Zunächst wird 5 Min., nach Zugabe von 800 ccm absol. Äther weitere 30 Min. gerührt und danach vom auskristallisierten *Triäthylaminhydrochlorid* abfiltriert. Das Filtrat dampft man i. Vak. ein und trocknet den erhaltenen farblosen, zähen Sirup im Exsikkator über P_2O_5 bei 0.05 Torr. Der farblose, sehr zähe Sirup (7.28 g; 80%, ber. auf *Phenylalanyl-valin-benzyloxycarbonylhydrazid-hydrochlorid*) wird in 50 ccm *Dimethylformamid* mit einer Lösung von 7.7 g (10% Überschuß) *Trifluoracetyl-L-glutaminyll-L-asparaginsäure- β -tert.-butylester* [20-21d] in 50 ccm *Dimethylformamid* vereinigt. Nach Kühlen auf -10° setzt man eine Lösung von 4.4 g *Dicyclohexylcarbodiimid* in 30 ccm *Acetonitril* zu und rührt 3 Stdn. bei dieser Temperatur. Die über Nacht im Kühlschrank aufbewahrte Lösung wird vom ausgefallenen *Dicyclohexylharnstoff* filtriert und nach Eindampfen i. Vak. mit 100 ccm Wasser versetzt. Nach 5 Stdn. bei 0° wird die voluminöse Fällung abfiltriert, mit 50 ccm Wasser gewaschen und über P_2O_5 i. Vak. getrocknet.

Das erhaltene Produkt wird zunächst aus *Dimethylformamid*/Wasser umkristallisiert, dann in 50 ccm *Dimethylformamid*/*Tetrahydrofuran* (1 : 1) gelöst, die Lösung über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und filtriert. Das Filtrat dampfte man i. Vak. ein und behandelt den Rückstand mit 100 ccm absol. Äthanol. Nach mehrstdg. Stehenlassen bei -10° wird abgesaugt, mit absol. Äthanol gewaschen und über P_2O_5 bei 50°/0.05 Torr getrocknet, Schmp. 235–236° (Zers.), $[\alpha]_D^{25}$: $-37.6 \pm 0.8^\circ$ ($c = 2$, in *Dimethylformamid*). Ausb. 7.05 g (~55%).

$C_{37}H_{48}F_3N_7O_{10}$ (807.8) Ber. C 55.01 H 5.99 N 12.14 Gef. C 55.1 H 6.3 N 12.1

11. *Trifluoracetyl-L-glutaminyll-L-asparagyl*(β -*tert*.-butylester)-*L*-phenylalanyl-*L*-valin-hydrazid [20-23b]: 5.0 g *Trifluoracetyl-glutaminyll-asparagyl*(β -*tert*.-butylester)-*phenylalanyl-valin-benzyloxycarbonylhydrazid* [20-23a] in 50 ccm *Dimethylformamid* werden nach Zugabe von 1.0 ccm *Eisessig* in Gegenwart von *Pd-Schwarz* bis zur Beendigung der CO_2 -Abspaltung hydriert (*Vibromischer*). Das Filtrat dampft man i. Vak. ein, versetzt den öligen Rückstand mit 50 ccm Wasser und läßt im Kühlschrank kristallisieren. *Mikrokristallines Pulver* nach Trocknen i. Vak. über P_2O_5 , Schmp. 236° (Zers.), $[\alpha]_D^{25}$: $-33.1 \pm 0.8^\circ$ ($c = 2$, in *Dimethylformamid*). Ausb. 4.0 g (96%).

$C_{29}H_{42}F_3N_7O_8$ (673.7) Ber. C 51.70 H 6.28 N 14.56 Gef. C 51.8 H 6.40 N 14.4

12. *Benzyloxycarbonylhydrazin-hydrochlorid*: Zu einer auf -5° gekühlten Mischung von 243 ccm (5.00 Mol) 100-proz. *Hydrazinhydrat* und 1000 ccm Äther tropft man unter kräftigem Rühren und Kühlen während 75 Min. 144.5 ccm (1.00 Mol) *Chlorameisensäure-benzylester* so zu, daß eine Reaktionstemperatur zwischen 0 und -2° eingehalten wird. Man rührt 1 Stde. ohne Kühlung nach, gibt bis zur Auflösung des gebildeten Niederschlags Wasser zu und trennt die Phasen. Die Ätherlösung wird mit wenig Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und mit trockenem Chlorwasserstoff behandelt. Die gebildete Fällung wird abfiltriert und über P_2O_5 und Kaliumhydroxid i. Vak. scharf getrocknet, Schmp. $170-171^{\circ}$ (Lit.⁷⁾: $170-170.5^{\circ}$). Ausb. 179–187 g (89–93%).

⁷⁾ K. HOFMANN, A. LINDENMANN, M. Z. MAGER und N. HAO KHAN, J. Amer. chem. Soc. **74**, 470 [1952].