

Erich Wünsch und Anton Zwick

Zur Synthese des Glucagons, VIII¹⁾

Darstellung der Sequenz 1—8

Aus dem Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung,
Abteilung für Peptidchemie, München

(Eingegangen am 25. Juni 1965)

■

Die Synthese von tert.-Butyloxycarbonyl-L-histidyl-L-seryl-L-glutaminyglycyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-L-serin-hydrazid, der *N*-geschützten verknüpfungsfähigen Teilsequenz 1—8 des Glucagons, nach zwei verschiedenen Wegen wird beschrieben.

■

Über die Darstellung zweier Tetrapeptidderivate mit der Sequenz 1—4 und 5—8 des Glucagons haben wir bereits berichtet^{2,3)}. Die Verknüpfung von tert.-Butyloxycarbonyl-histidyl-seryl-glutaminyglycin [1-4b] und Threonyl-phenylalanyl-threonyl-*O*-benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid [5-8b] bereitete einige Schwierigkeiten. Sie gelang jedoch mit guter Ausbeute nach dem Carbodiimidverfahren, als wir die Tetrapeptidverbindung [1-4c] in serinhydroxylgeschützter Form (Benzyläther) einsetzten, die durch vorsichtige alkalische Verseifung des entsprechenden Nitrobenzylesters [1-4a]²⁾ zugänglich war.

Das erhaltene tert.-Butyloxycarbonyl-histidyl-*O*-benzyl-seryl-glutaminyglycyl-threonyl-phenylalanyl-threonyl-*O*-benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid [1-8a] ließ sich hydrogenolytisch in das gewünschte BOC-Octapeptidhydrazid [1-8b] überführen.

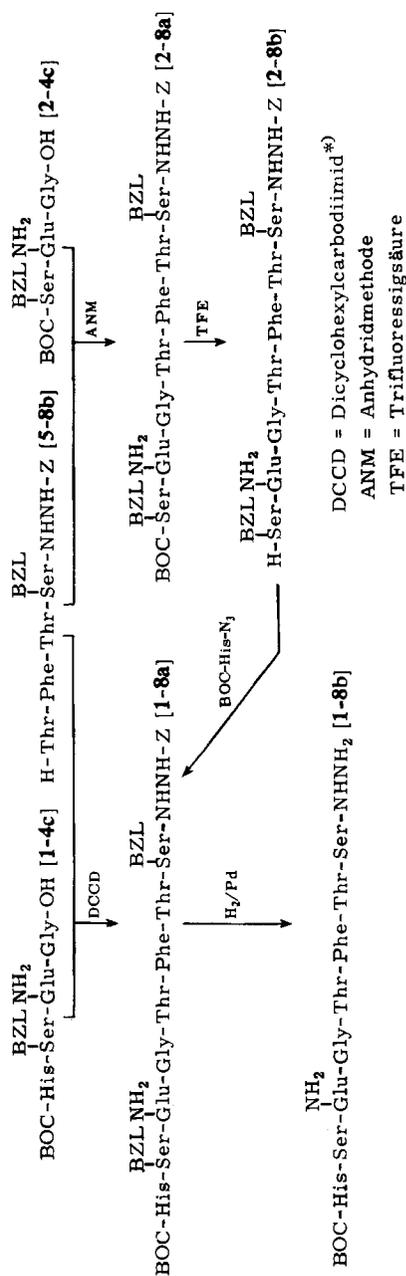
Erfolgreicher erwies sich jedoch der Aufbau der Octapeptidsequenz [1-8a] durch Verknüpfung des Tetrapeptid-Derivats [5-8b] mit tert.-Butyloxycarbonyl-*O*-benzyl-seryl-glutaminyglycin [2-4c]²⁾ zum kristallisierten BOC-Heptapeptid-benzyloxycarbonylhydrazid [2-8a], protonensolvolytische Abspaltung des BOC-Restes mit Trifluoressigsäure zum Heptapeptid-benzyloxycarbonylhydrazid [2-8b] und anschließenden Anbau von BOC-Histidin nach dem Azid-Verfahren.

Katalytische Hydrogenolyse der Benzyloxycarbonyl- und Benzyläther-Schutzgruppen ergab chromatographisch und analytisch reines tert.-Butyloxycarbonyl-histidyl-seryl-glutaminyglycyl-threonyl-phenylalanyl-threonyl-serin-hydrazid [1-8b], identisch mit dem nach 4 + 4-Verknüpfung isolierten Produkt.

1) VII. Mitteil.: E. Wünsch, F. Drees und J. Jentsch, Chem. Ber. **98**, 803 (1965), auszugsweise vorgetragen: E. Wünsch, VII. Europ. Peptid-Symposium, Budapest 1964.

2) I. Mitteil.: E. Wünsch und A. Zwick, Chem. Ber. **97**, 2497 (1964).

3) II. Mitteil.: E. Wünsch und G. Wendberger, Chem. Ber. **97**, 2504 (1964).



*) Zur Abkürzung der Aminosäuren und Schutzgruppen siehe G. T. Young, E. Wünsch und R. Schwyzler, Proc. 5th Europ. Sympos. on Peptides, Oxford 1963, S. 261, Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris 1963.

Den *Farbwerken Hoechst AG* und den *Farbenfabriken Bayer AG* sind wir wiederum für die umfangreiche finanzielle und materielle Förderung vorliegender und folgender Arbeiten über Glucagon-Sequenzen zu hohem Dank verpflichtet.

Herrn *H. Stocker* danken wir für seine ausgezeichnete technische Mitarbeit, Fräulein *R. Scharf* für die Ausführung der Aminosäure-Analysen.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren im Apparat nach Dr. Tottoli bestimmt und die spez. Drehwerte im lichtelektrischen Polarimeter der Firma Carl Zeiss ermittelt; die Werte der D-Linie wurden berechnet. Der chromatographische Reinheitstest der Zwischen- und Endprodukte erfolgte nach üblichen Verfahren der Papier- und Dünnschichtchromatographie jeweils mindestens mit zwei Lösungsmittelsystemen.

1. *tert.-Butyloxycarbonyl-L-histidyl-O-benzyl-L-seryl-L-glutaminyglycyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [2-8a]: 4.8 g (10 mMol) *tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-seryl-L-glutaminyglycyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [2-4c]²⁾ in 50 ccm Dioxan werden mit 6.6 ccm *n NaOH* bei pH 11.6 innerhalb 75 Min. verseift, danach unter Kühlung mit der äquiv. Menge *n HCl* neutralisiert. Der nach Eindampfen i. Vak. zur Trockne erhaltene Rückstand wird in heißem Methyläthylketon digeriert. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Wasser Schmp. 184–187° (Zers.), $[\alpha]_D^{20}$: $-8.7 \pm 0.5^\circ$; $[\alpha]_{546}^{20}$: -10.8° ($c = 1$, in 80-proz. Essigsäure). Ausb. 3.73 g (89%).

$C_{28}H_{39}N_7O_9 \cdot 1.5 H_2O$ (644.7) Ber. C 52.17 H 6.57 N 15.21

Gef. C 52.20 H 6.41 N 15.21

2. *tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-seryl-L-glutaminyglycyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [2-8a]: 4.8 g (10 mMol) *tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-seryl-L-glutaminyglycyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [5-8b]³⁾ in 150 ccm Dioxan/Tetrahydrofuran (1 : 2) werden in Gegenwart von 1.39 ccm Triäthylamin bei -15° mit 0.96 ccm Chlorameisensäure-äthylester wie üblich zum gemischten Anhydrid umgesetzt; das erhaltene Reaktionsgemisch wird mit der Lösung von 6.92 g (10 mMol) *Threonyl-phenylalanyl-threonyl-O-benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [5-8b]³⁾ in 100 ccm Dioxan vereinigt. Man läßt 20 Min. bei -5° und weitere 2 Stdn. bei Raumtemperatur nachrühren, zieht das Lösungsmittel i. Vak. ab und versetzt den Rückstand mit kalter 5-proz. Citronensäurelösung. Der abfiltrierte Rückstand wird mit heißem Wasser behandelt und aus viel Methanol umkristallisiert: Schmp. unscharf ab 220° (Zers.), $[\alpha]_D^{20}$: $-22.0 \pm 0.5^\circ$; $[\alpha]_{546}^{20}$: -26.8° ($c = 0.93$, in 80-proz. Essigsäure). Ausb. 8.2 g (71%).

$C_{57}H_{74}N_{10}O_{16} \cdot 1/2 H_2O$ (1164.3) Ber. C 58.82 H 6.49 N 12.02

Gef. C 58.70 H 6.68 N 11.91

3. *O-Benzyl-L-seryl-L-glutaminyglycyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serin-benzyloxycarbonylhydrazid-trifluoacetat* [2-8b]·CF₃CO₂H: 5.0 g (4.3 mMol) BOC-Heptapeptid-benzyloxycarbonylhydrazid [2-8a] werden mit 10 ccm Trifluoressigsäure versetzt und bis zur vollständigen Lösung bei Raumtemperatur geschüttelt (ca. 60 Min.). Nach Zugabe von absol. Äther und mehrstdg. Stehenlassen im Kühlschrank wird das gallertartige Produkt abfiltriert, mit Äther gewaschen und über KOH im Vakuumexsiccator getrocknet. Das erhaltene Material wird in der Reibschale mehrmals mit 10-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung verrieben, abgesaugt und mit kaltem Wasser gewaschen. Aus Methanol Schmp. 205° (Zers.), $[\alpha]_D^{20}$: $-18.1 \pm 0.5^\circ$; $[\alpha]_{546}^{20}$: -21.8° ($c = 1.4$, in 80-proz. Essigsäure). Ausb. 5.0 g (98%).

$C_{52}H_{66}N_{10}O_{14} \cdot CF_3CO_2H$ (1169.2) Ber. C 55.47 H 5.78 F 4.88 N 11.97

Gef. C 55.48 H 5.94 F 4.52 N 11.94

4. *tert.-Butyloxycarbonyl-L-histidyl-O-benzyl-L-seryl-L-glutaminyglycyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [1-8a]

a) 1.45 g (5.4 mMol) *tert.-Butyloxycarbonyl-histidin-hydrazid* [1c]²⁾ in 3 ccm Dimethylformamid werden bei -5° mit 4.58 ccm 2.36 *n* HCl/Tetrahydrofuran und 0.73 ccm *Isoamyl-nitrit*, nach ca. 10 Min. mit 1.50 ccm (10.8 mMol) *Triäthylamin* versetzt. Dazu gibt man die Lösung von 4.20 g (3.6 mMol) *Heptapeptid-Derivat* [2-8b]·CF₃CO₂H in 8 ccm Dimethylformamid und 0.51 ccm *Triäthylamin*. Nach 4 Tagen wird i. Vak. zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit 50 ccm heißem Wasser behandelt und abgesaugt. Aus 80-proz. Äthanol/Dimethylformamid (5 : 1) Schmp. 213° (Zers.), $[\alpha]_D^{20}$: $-20.5 \pm 0.5^{\circ}$; $[\alpha]_{546}^{20}$: -25.3° ($c = 1.45$, in 80-proz. Essigsäure). Ausb. 3.9 g (84%).

C₆₃H₈₁N₁₃O₁₇ (1292.4) Ber. C 58.55 H 6.32 N 14.09 Gef. C 58.58 H 6.23 N 14.09

b) Zu 914 mg (1.42 mMol) *tert.-Butyloxycarbonyl-histidyl-O-benzyl-seryl-glutaminyglycyl-L-threonyl-L-serin-hydrazid* [1-4c] und 308 mg *Dicyclohexylcarbodiimid* in 5 ccm Dimethylformamid werden tropfenweise unter Rühren 982 mg (1.42 mMol) *Threonyl-phenylalanyl-threonyl-O-benzyl-serin-benzyloxycarbonylhydrazid* [5-8b] in 3 ccm Dimethylformamid gegeben. Nach 24 stdg. Stehenlassen bei 5° arbeitet man wie unter a) auf: Schmp. 211° (Zers.), $[\alpha]_D^{20}$: $-20.6 \pm 0.5^{\circ}$; $[\alpha]_{546}^{20}$: -25.2° ($c = 1.01$, in 80-proz. Essigsäure). Ausb. 1.41 g (77%).

5. *tert.-Butyloxycarbonyl-L-histidyl-L-seryl-L-glutaminyglycyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-L-serin-hydrazid* [1-8b]: 17.0 g (13.15 mMol) des geschützten *Octapeptids* [1-8a] in 200 ccm 80-proz. Essigsäure werden in Gegenwart von Pd-Schwarz 72 Stdn. hydriert. Das Filtrat engt man i. Vak. ein und dampft den Rückstand mehrmals mit Benzol i. Vak. ab. Die Lösung in wenig Dimethylformamid läßt man in Äther einfließen; die gebildete Fällung wird abfiltriert und i. Vak. getrocknet: Schmp. 190.5° (Zers.), $[\alpha]_D^{20}$: $-27.2 \pm 0.5^{\circ}$; $[\alpha]_{546}^{20}$: -32.5° ($c = 1$, in 80-proz. Essigsäure) bzw. $[\alpha]_D^{20}$: $-47.4 \pm 1^{\circ}$; $[\alpha]_{546}^{20}$: -56.5° ($c = 0.5$, in Wasser). Ausb. 12.6 g (92%).

C₄₁H₆₃N₁₃O₁₅·CH₃CO₂H (1038.1) Ber. C 49.75 H 6.51 N 17.54

Gef. C 49.75 H 6.74 N 17.34

<i>Aminosäure-Analyse:</i>	His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	NH ₃
Ber.	1	2	1	1	2	1	1
Gef.	0.9	1.92	1.04	1.0	1.96	0.97	1.04

[294/65]