

Erich Wünsch und Anton Zwick

Zur Synthese des Glucagons, IX<sup>1)</sup>

## Darstellung der Sequenz 9–15

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

(Eingegangen am 25. Juni 1965)

Die Synthese von Benzyloxycarbonyl-L-asparagyl( $\beta$ -tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester, der verknüpfungsfähigen Teilsequenz 9–15 des Glucagons, wird beschrieben.

Ausgehend von N<sup>ε</sup>-tert.-Butyloxycarbonyl-lysyl-tyrosyl-leucyl-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester [12-15c], in fast quantitativer Ausbeute durch katalytische Hydrogenolyse aus dem Benzyloxycarbonyl-Derivat [12-15b] zugänglich<sup>2)</sup>, konnten wir durch stufenweisen Anbau am Aminoende die Synthese des N-geschützten Heptapeptid-Derivats [9-15] vollziehen: Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-serin [11a] ließ sich nach dem Alkylkohlen säureanhydrid-Verfahren in guter Ausbeute mit dem freien Tetrapeptid [12-15c] in Gegenwart von einem Äquiv. Triäthylamin zum Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-seryl-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-lysyl-tyrosyl-leucyl-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester [11-15a] verknüpfen; erfolgreicher verlief die Synthese bei Anwendung von Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-serin-[p-nitro-phenylester] [11b]: das Peptidderivat [11-15a] wurde in gut kristallisierter Form isoliert.

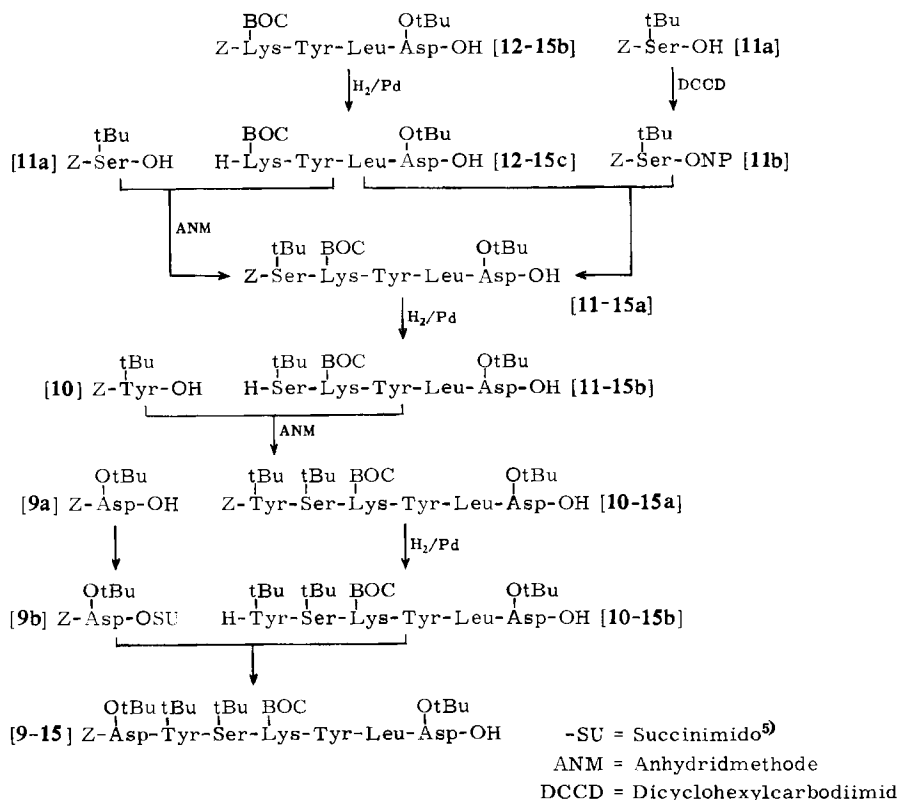
Hydrogenolytische Entfernung des Benzyloxycarbonylrestes erbrachte in 90-proz. Ausbeute das freie Pentapeptid [11-15b]; dessen Umsetzung mit Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-tyrosin [10] nach dem Anhydrid-Verfahren führte zum N-Acyl-hexapeptid-Derivat [10-15a]. Nach katalytischer Abspaltung der Aminoschutzgruppe gelang der Anbau des Asparaginsäurerestes an das erhaltene Hexapeptid [10-15b] zum gewünschten Benzyloxycarbonyl-asparagyl( $\beta$ -tert.-butylester)-O-tert.-butyl-tyrosyl-O-tert.-butyl-seryl-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-lysyl-tyrosyl-leucyl-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester [9-15] mit Hilfe von Benzyloxycarbonyl-asparaginsäure- $\alpha$ -[N-hydroxy-succinimidester]- $\beta$ -tert.-butylester [9b]; letzteres Derivat konnte nach Anderson<sup>3)</sup> in 75-proz. Ausbeute aus kristallinem Benzyloxycarbonyl-asparaginsäure- $\beta$ -tert.-butylester [9a] erhalten werden<sup>4)</sup>.

<sup>1)</sup> VIII. Mitteil.: E. Wünsch und A. Zwick, Chem. Ber. **99**, 101 (1966), vorstehend.

<sup>2)</sup> IV. Mitteil.: E. Wünsch und A. Zwick, Chem. Ber. **97**, 3305 (1964).

<sup>3)</sup> G. W. Anderson, J. E. Zimmerman und F. M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. **85**, 3039 (1963); **86**, 1839 (1964).

<sup>4)</sup> M. Löw und G. L. Kisfaludy, VII. Europ. Peptidsymposium, Budapest 1964, geben einen Schmelzpunkt von 150–152° an.

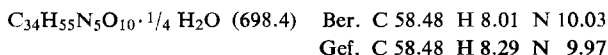


Für die ausgezeichnete technische Mitarbeit danken wir Herrn *H. Stocker* und Fräulein *C. Wolf*.

### 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.

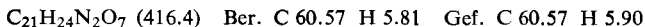
1. *N<sup>ε</sup>-tert.-Butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure-β-tert.-butylester [12-15c]*: 40.0 g (48.3 mMol) *Benzyloxycarbonyl-tetrapeptid [12-15b]*<sup>2)</sup> in 600 ccm Methanol und 300 ccm 80-proz. Essigsäure werden in Gegenwart von Pd-Schwarz 24 Stdn. hydriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wird der erhaltene Rückstand aus Methanol bzw. Methanol/Wasser umkristallisiert: Schmp. 195–196° (Zers.),  $[\alpha]_D^{20}$ : +11.5 ± 0.5°;  $[\alpha]_{546}^{20}$ : +14.0° (c = 1, in 80-proz. Essigsäure);  $R_F$  0.80 (n-Amylalkohol/Pyridin/Wasser 35 : 35 : 30). Ausb. 32.6 g (96%).



<sup>5)</sup> Abkürzungen siehe *G. Young, E. Wünsch und R. Schwyzer, Proc. 5th Europ. Sympos. on Peptides, Oxford 1963, S. 261, Pergamon Press Oxford, London, New York, Paris 1963.*

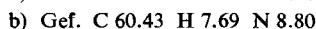
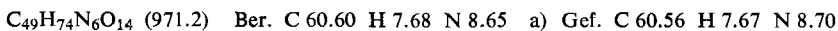
2. *Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-serin* [11a]: 47.7 g (0.10 Mol) *DCHA-Salz*<sup>6)</sup> von [11a] werden in 500 ccm Essigester suspendiert und werden mit 150 ccm 20-proz. Citronensäurelösung 20 Min. geschüttelt, wobei zuerst Lösung und dann Fällung von Dicyclohexylaminocitrat eintritt. Das Filtrat wird je zweimal mit 10-proz. Citronensäurelösung und Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und i. Vak. eingedampft. Aus Äther/Petroläther Schmp. 86.5–87.5°,  $[\alpha]_D^{20}$ : +22.5 ± 0.5°;  $[\alpha]_{546}^{20}$ : +25.6° (*c* = 2, in Äthanol) (Lit.: 87–87.5°<sup>7)</sup>, 83.5–85°<sup>8)</sup>,  $[\alpha]_D^{25}$ : +22.7°<sup>7)</sup> (*c* = 2, in Äthanol). Ausb. 28.4 g (96%).

3. *Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-serin-[p-nitro-phenylester]* [11b]: 20.0 g (67.8 mMol) *Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-serin* [11a] und 9.9 g (71.4 mMol) *p-Nitro-phenol* in 100 ccm Acetonitril werden mit 14.6 g (71.4 mMol) *Dicyclohexylcarbodiimid* bei –5° unter Rühren versetzt. Man läßt 1 Stde. bei –5° und 12 Stdn. unter Erreichen von Raumtemperatur weiter-rühren, filtriert vom Harnstoff ab und dampft die Lösung i. Vak. ein. Aus Diisopropyläther Schmp. 55–56°,  $[\alpha]_D^{20}$ : –21.2 ± 0.5°;  $[\alpha]_{546}^{20}$ : –26.3° (*c* = 1, in Methanol). Ausb. 24.6 g (87%).



4. *Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure-β-tert.-butylester* [11-15a]

a) Zu 5.9 g (20 mMol) [11a] und 2.78 ccm *Triäthylamin* in 100 ccm Tetrahydrofuran läßt man bei –10° unter Rühren 1.91 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* tropfen und gibt nach 5 Min. die Lösung von 14 g *Tetrapeptid* [12-15c] und 2.78 ccm *Triäthylamin* in 300 ccm Dimethylformamid/Tetrahydrofuran (2:1) zu. Nach 4 Stdn. Rühren bei Raumtemperatur wird i. Vak. eingedampft und der Rückstand mit Essigester und 20-proz. Citronensäurelösung behandelt. Die abgetrennte organ. Phase wird nach Waschen mit Wasser und Trocknen über Natriumsulfat i. Vak. auf die Hälfte eingengt und mit 4 ccm Dicyclohexylamin versetzt. Der gebildete Niederschlag wird abgesaugt und zweimal aus Essigester umkristallisiert. Das *DCHA-Salz* wird wie üblich mit 20-proz. Citronensäurelösung zersetzt und die erhaltene Essigesterlösung des Acylpentapeptids i. Vak. eingedampft. Aus Essigester/Äther Schmp. 182° (176°),  $[\alpha]_D^{20}$ : –14.7 ± 0.5°;  $[\alpha]_{546}^{20}$ : –17.9° (*c* = 1, in Äthanol). Ausb. 15.4 g (79%).



b) 37.4 g (53.6 mMol) *Tetrapeptid* [12-15c] und 7.45 ccm *Triäthylamin* in 200 ccm Pyridin werden mit 22.4 g (53.6 mMol) [11b] versetzt, 40 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt und danach i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Man arbeitet wie unter a) auf und kristallisiert aus Isopropylalkohol um: Schmp. 192–193°,  $[\alpha]_D^{20}$ : –15.0 ± 0.5°,  $[\alpha]_{546}^{20}$ : –18.0° (*c* = 2.14, in Äthanol). Ausb. 42.5 g (82%).

5. *O-tert.-Butyl-L-seryl-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure-β-tert.-butylester* [11-15b]: 10.4 g (10.7 mMol) *Benzyloxycarbonyl-pentapeptid* [11-15a] in 90-proz. Methanol und einigen Tropfen Eisessig werden in Gegenwart von Pd-Schwarz bis zur Beendigung der Kohlendioxid-Entwicklung hydriert. Die filtrierte und i. Vak. eingedampfte Lösung hinterläßt einen Rückstand, der aus 90-proz. Methanol kristallisiert: Schmp. über 250° (Zers.),  $[\alpha]_D^{20}$ : –24.9 ± 0.5°;  $[\alpha]_{546}^{20}$ : –29.3° (*c* = 1, in Dimethylformamid). Ausb. 8.9 g (92%).



6) E. Wünsch und J. Jentsch, Chem. Ber. **97**, 2490 (1964).

7) F. M. Callahan, G. W. Anderson, R. Paul und J. E. Zimmerman, J. Amer. chem. Soc. **85**, 201 (1963).

8) E. Schröder, Liebigs Ann. Chem. **670**, 127 (1963).

6. *Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-tyrosin* [10]: *Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-DCHA-Salz*<sup>6)</sup> wird, wie unter 2. beschrieben, umgesetzt. Kristalle aus Äther/Petroläther vom Schmp. 76–78°,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $+9.55 \pm 0.5^\circ$ ;  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $+12.1^\circ$  ( $c = 2$ , in Essigsäure) (Lit.<sup>8)</sup>: Öl). Ausb. 96%.

$C_{21}H_{25}NO_5$  (371.4) Ber. C 67.91 H 6.78 N 3.77 Gef. C 68.04 H 6.67 N 3.75

7. *Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure-β-tert.-butylester* [10-15a]: Zu 1.85 g (5.0 mMol) [10] und 0.7 ccm Triäthylamin in 30 ccm Tetrahydrofuran läßt man bei  $-10^\circ$  unter Rühren 0.47 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* tropfen. Nach ca. 5 Min. werden 4.21 g (5.0 mMol) *Pentapeptid* [11-15b] und 0.7 ccm Triäthylamin in 40 ccm Dimethylformamid zugegeben. Nach 6stdg. Rühren bei Raumtemperatur wird i. Vak. eingedampft und der resultierende Rückstand zwischen Essigester und 10-proz. Citronensäurelösung verteilt. Nach üblicher Aufarbeitung der abgetrennten Essigesterphase und Umkristallisieren aus Essigester/Diisopropyläther Schmp.  $181^\circ$  (Zers.),  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-14.9 \pm 0.5^\circ$ ;  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-17.5^\circ$  ( $c = 1.2$ , in Äthanol); Ausb. 4.98 g (82%).

$C_{62}H_{91}N_7O_{16} \cdot 1 H_2O$  (1208.5) Ber. C 61.62 H 7.76 N 8.11 Gef. C 61.60 H 7.83 N 8.22

8. *O-tert.-Butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N<sup>ε</sup>-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure-β-tert.-butylester* [10-15b]: 4.0 g (3.32 mMol) *Benzyloxycarbonyl-hexapeptid* [10-15a] werden in Methanol/Dimethylformamid/80-proz. Essigsäure (50 : 50 : 4), wie unter 5. beschrieben, hydriert und aufgearbeitet. Aus 60-proz. Äthanol Schmp. über  $250^\circ$  (Zers.),  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-21.5 \pm 1^\circ$ ;  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-26.8^\circ$  ( $c = 0.48$ , in Dimethylformamid). Ausb. 2.80 g (79%).

$C_{54}H_{85}N_7O_{14} \cdot 1 H_2O$  (1074.4) Ber. C 60.36 H 8.16 N 9.13 Gef. C 60.32 H 7.98 N 9.16

In einem zweiten Ansatz wurde die Verbindung als Hemihydrat isoliert. Schmp. über  $250^\circ$  (Zers.),  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-21.9 \pm 0.5^\circ$ ;  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-27.3^\circ$  ( $c = 1.8$ , in Dimethylformamid). Ausb. 78%.

Ber. C 61.40 H 8.11 Gef. C 61.46 H 7.88

9. *Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure-β-tert.-butylester* [9a]: 118 g *Benzyloxycarbonyl-asparaginsäure-α-methylester-β-tert.-butylester*<sup>9)</sup> in 600 ccm Dioxan/Wasser (5 : 1) werden wie üblich mit 350 ccm *n NaOH* titrimetrisch (Thymolphthalein) verseift. Man stellt mit *n HCl* auf pH 4.5, entfernt i. Vak. den größten Teil Dioxan und säuert schließlich mit überschüss. Citronensäurelösung an. Das abgeschiedene Öl wird mit Äther aufgenommen, die abgetrennte Ätherphase mit Wasser gewaschen und schließlich mit Kaliumhydrogencarbonatlösung erschöpfend extrahiert. Das beim Ansäuern der Extrakte mit eiskalter Citronensäurelösung ausfallende Öl wird erneut mit Äther aufgenommen, die Ätherphase mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird über  $P_2O_5$  im Vakuumexsikkator scharf getrocknet, in absol. Äther gelöst und mit Petroläther bis zur beginnenden Trübung versetzt. Nach mehrtägigem Stehenlassen, rasch nach Animpfen, scheiden sich farblose Kristalle ab: Schmp. 76–78°,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-12.95 \pm 1^\circ$ ;  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-15.2^\circ$  ( $c = 1$ , in Pyridin) bzw.  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-3.4 \pm 1^\circ$ ;  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-4.8^\circ$  ( $c = 1$ , in Methanol). Ausb. 104 g (92%).

$C_{16}H_{21}NO_6$  (323.4) Ber. C 59.43 H 6.55 N 4.33 Gef. C 59.46 H 6.69 N 4.52

10. *Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure-α-[N-hydroxy-succinimidester]-β-tert.-butylester* [9b]: 32.3 g (0.10 Mol) [9a] und 11.7 g *N-Hydroxy-succinimid* in 100 ccm Dioxan versetzt man bei  $0^\circ$  mit 22.6 g *Dicyclohexylcarbodiimid* in 20 ccm Dioxan. Nach 40stdg. Rühren wird vom Harnstoff abfiltriert, das Filtrat i. Vak. eingedampft und der Rückstand aus wenig Isopropyl-

<sup>9)</sup> E. Wünsch und A. Zwick, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 333, 108 (1963).

alkohol umkristallisiert: Schmp. 151.5–152.5°,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-19.4 \pm 0.5^\circ$ ;  $[\alpha]_{246}^{20}$ :  $-23.9^\circ$  ( $c = 1.12$ , in Dioxan). Ausb. 31.5 g (75%)<sup>10)</sup>.

$C_{20}H_{24}N_2O_8$  (420.4) Ber. C 57.17 H 5.75 N 6.66 Gef. C 57.04 H 5.63 N 6.58

11. *Benzoyloxycarbonyl-L-asparagyl*( $\beta$ -*tert.*-*butylester*)-*O*-*tert.*-*butyl-L-tyrosyl-O*-*tert.*-*butyl-L-seryl-N<sup>e</sup>.*-*tert.*-*butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsäure*- $\beta$ -*tert.*-*butylester* [9-15]: 2.56 g (2.38 mMol) *Hexapeptid* [10-15b] in 50 ccm Dioxan/Dimethylformamid (2 : 3) werden unter Rühren 0.33 ccm *Triäthylamin* und anschließend 1.0 g (2.38 mMol) [9b] über 2 Stdn. zugesetzt. Die auf Zugabe von 200 ccm 5-proz. Citronensäurelösung und 3stdg. Stehenlassen bei 0° filtrierte Fällung extrahiert man erschöpfend mit ca. 100 ccm Essigester. Die Essigesterlösung wird gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. auf ein Drittel eingeeengt. Bei kurzem Erhitzen unter Rückfluß tritt Kristallisation ein. Aus 60-proz. Äthanol farblose Kristalle vom Schmp. 203–205°,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-19.6 \pm 0.5^\circ$ ;  $[\alpha]_{246}^{20}$ :  $-22.9^\circ$  ( $c = 1$ , in Äthanol). Ausb. 2.65 g (82%).

$C_{70}H_{104}N_8O_{19}$  (1361.7) Ber. C 61.74 H 7.70 N 8.23 Gef. C 61.66 H 7.81 N 8.28

<i>Aminosäure-Analyse:</i>	Asp	Tyr	Ser	Lys	Leu
Ber.	2	2	1	1	1
Gef.	2.03	1.80	0.97	1.01	1.0

<sup>10)</sup> K. Hofmann, W. Haas, M. I. Smithers und G. Zanetti, J. Amer. chem. Soc. 87, 631 (1965), geben bei 78% Ausb. einen Schmp. 151–152° und  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-27.4^\circ$  ( $c = 1.1$ , in Dimethylformamid) an.