

Erich Wünsch und Fritz Drees

Zur Synthese des Glucagons, XIII¹⁾

Darstellung der Sequenz 22–29 (neuer Weg)

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

(Eingegangen am 16. September 1966)

Zur Darstellung von L-Phenylalanyl-L-valyl-L-glutaminyll-L-tryptophyll-L-leucyll-L-methionyll-L-asparaginyll-O-tert.-butyl-L-threonin-tert.-butylester, der geschützten Teilsequenz 22–29 des Glucagons, die sich als „Aminokomponente“ zum Aufbau höherer Sequenzen des Pankreashormons eignet, wird ein neuer, verbesserter Syntheseweg beschrieben.

In einer früheren Mitteilung hatten wir über die Synthese des allseits geschützten Octapeptids PHT-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(tBu)-OtBu [22-29a] berichtet²⁾. Die angestrebte Entacylierung mittels Hydrazin-acetat unter Befolgen der „Schwyzer-Technik“ verlief durchaus einwandfrei; die Trennung der beiden Reaktionsprodukte Phthaloylhydrazid und H-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(tBu)-OtBu [22-29c] ließ sich jedoch nur unter erheblichen Verlusten an [22-29c] bewerkstelligen.

Ein geeigneter Ausweg konnte allein in der Wahl einer anderen Blockierung der α -Aminogruppe zu finden sein. Im Hinblick auf die Anwesenheit eines Methionin-Restes in der Sequenz bzw. die Maskierung der Hydroxyl- und Carboxyl-Funktionen der carboxylendständigen Aminosäure (Threonin) mußte diese Wahl auf die 2-Nitrophenylsulfenyl-Schutzgruppe fallen.

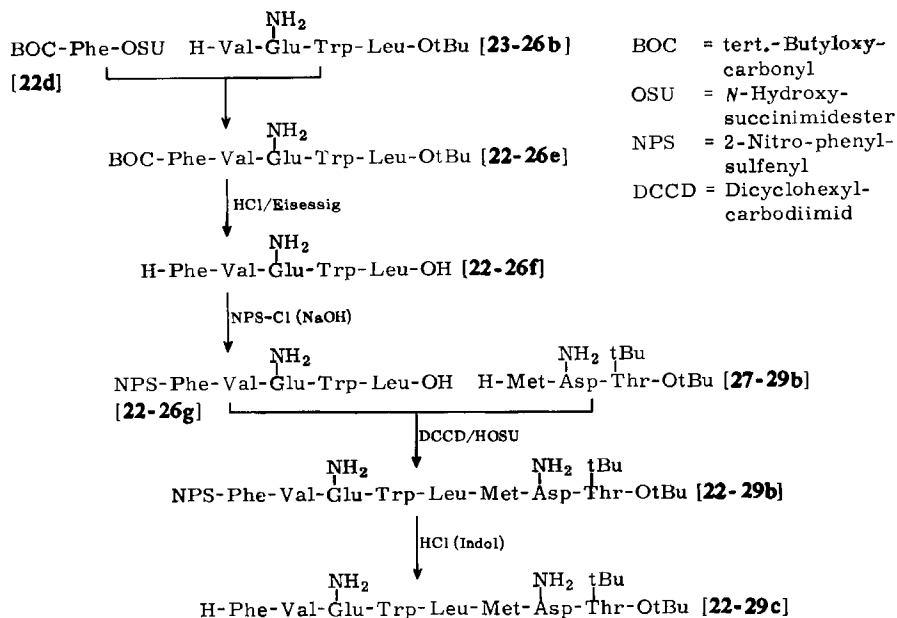
Wir haben zunächst unter Rückgriff auf den bereits früher beschriebenen Tetrapeptidester [23-26b]²⁾ durch Verknüpfung mit BOC-Phe-OSU [22d] BOC-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-OtBu [22-26e] hergestellt. Nach acidolytischer Entfernung der Schutzgruppen mittels Chlorwasserstoff in Eisessig konnte das in hoher Ausbeute anfallende freie Pentapeptid [22-26f] nunmehr mit 2-Nitrophenylsulfenylchlorid bei pH 7.5 zum NPS-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-OH [22-26g] acyliert werden.

Die Verknüpfung von [22-26g] mit H-Met-Asn-Thr(tBu)-OtBu [27-29b]³⁾ zum 2-Nitrophenylsulfenyl-octapeptidester [22-29b] gelang glatt (87% Ausbeute) in Analogie zu der früher beschriebenen Phthaloyl-Verbindung [22-29a] nach dem Carboimid-Hydroxysuccinimid-Verfahren. Nach Desulfenylierung von [22-29b]

¹⁾ XII. Mitteil.: E. Wünsch, A. Zwick und G. Wendberger, Chem. Ber. 100, 173 (1967).

²⁾ E. Wünsch und F. Drees, Chem. Ber. 99, 110 (1966).

³⁾ E. Wünsch, F. Drees und J. Jentsch, Chem. Ber. 98, 803 (1965).



mittels Chlorwasserstoff in inerten Lösungsmitteln in Gegenwart von 20 Äquivv. Indol⁴⁾ resultierte schließlich das gewünschte H-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(tBu)-OtBu [22-29c].

Den *Farbwerken Hoechst AG* sind wir für die umfangreiche finanzielle und materielle Unterstützung dieser und der folgenden Arbeiten erneut zu höchstem Dank verpflichtet.

Für die ausgezeichnete Mitarbeit danken wir Fräulein *B. Bouschka* (präparative Arbeiten) und Fräulein *R. Scharf* (analytische Arbeiten). Die Elementaranalysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium der Abteilung (Leiter *W. Beck*) ausgeführt.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren im Apparat nach Dr. Tottoli bestimmt und die spezif. 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 üblichem Verfahren der Papier- und Dünnschichtchromatographie jeweils mindestens mit zwei Lösungsmittelsystemen.

1. *tert.*-Butyloxy-carbonyl-*L*-phenylalanin-*[N*-hydroxy-succinimidester] [22d]: 80 g BOC-Phe-OH und 34.5 g *N*-Hydroxy-succinimid in 400 ccm Acetonitril werden bei -10° mit 65 g Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Die Reaktionsmischung wird 4 Stdn. bis Erreichen von Raumtemp. gerührt und anschließend über Nacht im Kühlschrank stehengelassen. Das Filtrat vom Dicyclohexylharnstoff wird i. Vak. eingedampft, der erhaltene feste Rückstand aus Essigester umkristallisiert: Nadeln vom Schmp. $152-153^\circ$; $[\alpha]_D^{20}$: $-20.72 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -25.66° ($c = 2.2$; in Dioxan)⁵⁾. Ausb. 95 g (88%).

⁴⁾ E. Wünsch, A. Fontana und F. Drees, Z. Naturforsch., im Druck.

⁵⁾ G. W. Anderson, J. E. Zimmermann und F. M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. **86**, 1839 (1964), geben bei gleichem Schmp. einen spezif. Drehwert $[\alpha]_D^{25}$: -19.0° ($c = 2$; in Dioxan) an.

2. *tert.-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-glutaminyll-L-tryptophyll-L-leucin-tert.-butylester* [22-26e]: 105.15 g *H-Val-Gln-Trp-Leu-OtBu* [23-26b]²⁾ in 2000 ccm Tetrahydrofuran werden bei 0° mit 63.35 g *BOC-Phe-OSU* [22d] unter Rühren versetzt. Bereits nach kurzer Zeit wird das Reaktionsgemisch nahezu fest. Nach 18stdg. Stehenlassen bei Raumtemp. wird der größte Teil des Tetrahydrofurans i. Vak. abgezogen und der Rückstand mit viel Wasser behandelt. Das abfiltrierte, mit Wasser gewaschene Material wird noch feucht aus Methanol umkristallisiert. Die farblosen Nadeln werden abfiltriert, mit Äther gewaschen und i. Vak. getrocknet: Schmp. 219–220°; $[\alpha]_D^{20}$: $-45.62 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -54.48° ($c = 2.1$; in Methanol). Ausb. 133.5 g (90%).

$C_{45}H_{65}N_7O_9$ (848.1) Ber. C 63.75 H 7.73 N 11.56 Gef. C 63.64 H 7.83 N 11.50

3. *L-Phenylalanyl-L-valyl-L-glutaminyll-L-tryptophyll-L-leucin* [22-26f]

a) 63.5 g *BOC-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-OtBu* [22-26e] werden mit 1000 ccm eiskaltem, Chlorwasserstoff-gesätt. Eisessig übergossen und 1 Stde. bei Raumtemp. stehengelassen. Die erhaltene Lösung dampft man i. Vak. ein; dabei kristallisiert das *Pentapeptidesterhydrochlorid* aus. Der Rückstand wird mit viel absol. Äther behandelt und nach Aufbewahren im Kühlschränk abfiltriert. Nach Trocknen i. Vak. über P_2O_5 und Kaliumhydroxid Schmp. 233–234° (Zers.). Ausb. 55 g (quantitativ).

b) 21.9 g *Pentapeptidesterhydrochlorid* in 100 ccm Dioxan und 250 ccm Wasser werden vorsichtig und unter Eiskühlung mit 30 ccm *n NaOH* versetzt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert und i. Vak. bei 40° getrocknet. Aus Dimethylformamid/Wasser Schmp. 228–229° (Zers.). Ausb. 18.6 g (90%, über beide Stufen).

$C_{36}H_{49}N_7O_7 \cdot 2H_2O$ (727.9) Ber. C 59.41 H 7.34 N 13.47 $2H_2O$ 4.99
Gef. C 59.31 H 7.31 N 13.64 H_2O 4.46

4. *2-Nitro-phenylsulfenyl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-glutaminyll-L-tryptophyll-L-leucin* [22-26g]: 13.8 g *H-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-OH* [22-26f] werden in 200 ccm Dioxan, 50 ccm Wasser und 20 ccm *n NaOH* bei Raumtemp. unter Rühren mit 4.17 g *2-Nitro-phenylsulfenylchlorid* und 22 ccm *n NaOH* bei pH 7.5 acyliert. Man rührt 30 Min. nach, verdünnt mit 100 ccm Wasser und säuert unter Eiskühlung mit 200 ccm 0.1 *n H_2SO_4* an, worauf die Lösung alsbald zu einer gallertigen Masse erstarrt. Das kräftig abgenutschte und mit Wasser gewaschene Produkt wird i. Vak. über P_2O_5 getrocknet. Nach Umfällen aus Dimethylformamid/Äther und 48stdg. Trocknen bei Raumtemp. und 10^{-2} Torr gelbliches Pulver vom Schmp. 216–218° (Zers.); $[\alpha]_D^{20}$: $+22.95 \pm 0.5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $+42.25^\circ$ ($c = 1.35$; in Dimethylformamid). Ausb. 14.5 g (86%).

$C_{42}H_{52}N_8O_9S$ (845.0) Ber. C 59.70 H 6.20 N 13.26 S 3.79
Gef. C 59.58 H 6.33 N 13.28 S 3.61

5. *2-Nitro-phenylsulfenyl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-glutaminyll-L-tryptophyll-L-leucyll-L-methionyll-L-asparaginyll-O-tert.-butyl-L-threonin-tert.-butylester* [22-29b]: 50.5 g *NPS-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-OH* [22-26g], 36.5 g *H-Met-Asn-Thr(tBu)-OtBu* [27-29b] und 7.5 g *N-Hydroxy-succinimid* in 500 ccm Dimethylformamid werden bei -10° mit 13.5 g *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt. Die Reaktionsmischung wird 3 Stdn. bei -5° und weitere 20 Stdn. bei Raumtemp. stehengelassen. Das Filtrat vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff hinterläßt nach Eindampfen i. Vak. einen festen Rückstand, der nach sorgfältigem Verreiben mit Wasser und Trocknen i. Vak. über P_2O_5 aus Dimethylformamid/Äther umgefällt wird. Schwach gelbliches Pulver; Schmp. 231–233° (Zers.). UV (80-proz. Äthanol) 380 (NPS) und 280 μ (Trp). Ausb. 67.5 g (87%).

$C_{63}H_{90}N_{12}O_{14}S_2$ (1303.6) Ber. C 58.05 H 6.96 N 12.89 S 4.92
Gef. C 57.80 H 7.11 N 12.70 S 5.03

6. *L-Phenylalanyl-L-valyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-leucyl-L-methionyl-L-asparaginylo-tert.-butyl-L-threonin-tert.-butylester* [22-29c]

a) 39.0 g *NPS-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(tBu)-OtBu* [22-29b] und 70 g Indol (20 Äquivv.) werden unter gelindem Erwärmen in ca. 200 ccm Dimethylformamid gelöst. Zu der auf 0° abgekühlten Lösung tropft man unter Rühren 56.5 ccm einer 1.1*n* Lösung von *Chlorwasserstoff* in Dioxan zu. Nach 30 Min. bei Raumtemp. filtriert man die Reaktionsmischung in 3000 ccm eiskalten absol. Äther ein; die entstandene blaßgelbe Fällung wird abfiltriert und mehrmals mit Äther gewaschen. Ausb. 35.5 g *Octapeptidester-hydrochlorid*.

b) Die Lösung des unter a) erhaltenen *Octapeptidester-hydrochlorids* (35.5 g) in 200 ccm Dimethylformamid läßt man unter Rühren und Eiskühlung in eine Lösung von 10 g *Natriumhydrogencarbonat* in ca. 3000 ccm Wasser langsam einfließen. Nach 30 Min. Nachrühren wird das ausgefallene Produkt abfiltriert, mit Wasser gewaschen und über P₂O₅ bei 10⁻² Torr getrocknet: schwach gelbliches Pulver vom Schmp. 243–245° (Zers.); $[\alpha]_D^{20}$: $-26.7 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -31.82° ($c = 1$; in 80-proz. Essigsäure). UV (80-proz. Äthanol) 280 m μ (Trp). Ausb. 27 g (78%, über beide Stufen).

$C_{57}H_{87}N_{11}O_{11}S$ (1150.5) Ber. C 59.51 H 7.62 N 13.39 S 2.79

Gef. C 59.36 H 7.73 N 13.27 S 2.89

Aminosäure-Analyse:

| | Phe | Val | Glu | Trp | Leu | Met | Asp | Thr | NH ₃ |
|------|------|-----|------|-----|-----|-----|------|------|-----------------|
| Ber. | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| Gef. | 0.99 | 1.0 | 0.99 | — | 1.0 | 1.0 | 1.04 | 0.97 | 1.96 |
| | | | | | | | | | [389/66] |