

Erich Wünsch, Anton Zwick und Ernst Jaeger

Zur Synthese des Glucagons, XVI¹⁾

Darstellung der Sequenz 1–6

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

(Eingegangen am 26. Juli 1967)

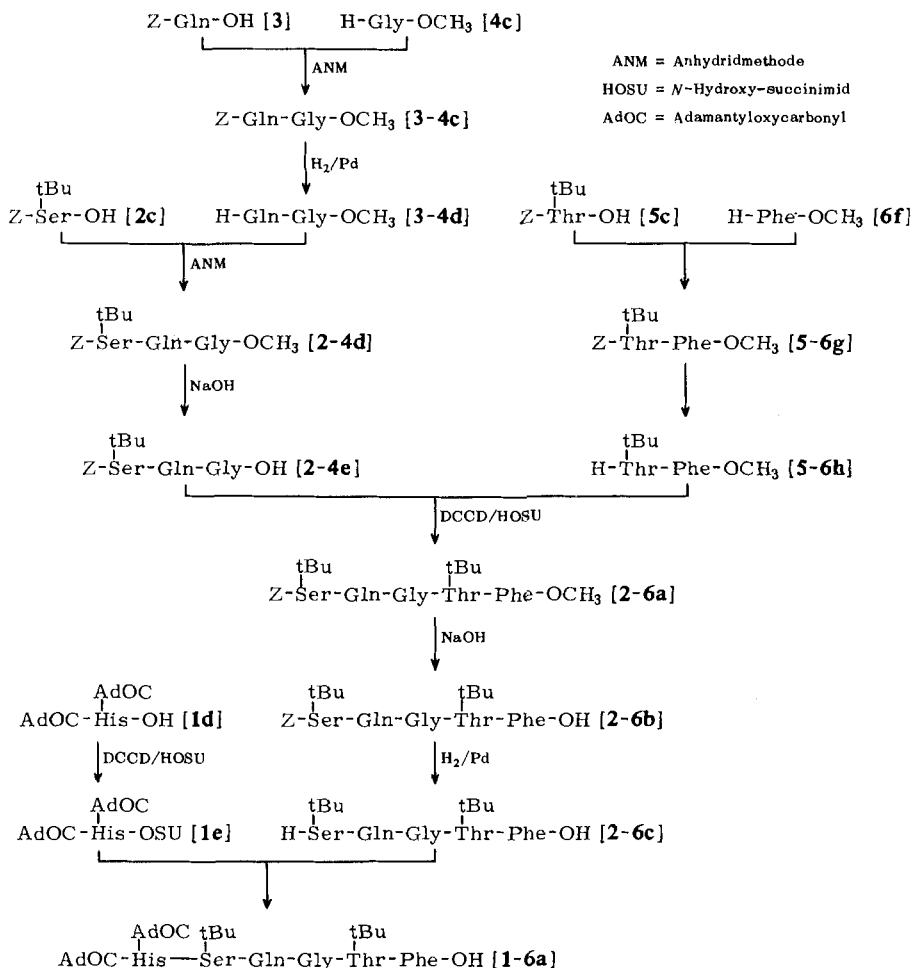
Die Synthese von N^{α},N^{im} -Bis-adamantylxycarbonyl-L-histidyl-*O*-tert.-butyl-L-seryl-L-glutaminyglycyl-*O*-tert.-butyl-L-threonyl-L-phenylalanin, eine geeignete Kopfkomponeute mit der Glucagon-Sequenz 1–6 zur Darstellung der jeweils allseits geschützten Sequenz 1–23 bzw. der Gesamtsequenz 1–29 des Pankreashormons durch Verknüpfung mit den entsprechend geschützten Glucagon-Bruchstücken 7–23 und 7–29, wird beschrieben.

In der vorausgehenden Mitteilung¹⁾ hatten wir kurz von unseren Fehlschlägen, BOC-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-N₃ (aus dem Hydrazid [1-8b]) mit H-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Arg(HBr)-Ala-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Val-OtBu [9-23c] zum Tricosapeptid-Derivat zu verknüpfen, und der daraufhin erfolgten Darstellung eines Heptadecapeptidesters [7-23c] berichtet. Für die Synthese des allseits geschützten Tricosapeptids mit der Sequenz 1–23 des Glucagons unter Verwendung von [7-23c] als „Aminokomponente“ war der Aufbau einer zweckmäßigen „Kopfkomponeute“, d. h. eines entsprechend geschützten Hexapeptid-Derivats mit der Sequenz 1–6 des Hormons erforderlich.

In üblichem stufenweisem Anbau von Z-Gln-OH [3] bzw. Z-Ser(tBu)-OH [2c] an H-Gly-OCH₃ [4c] wurde Z-Ser(tBu)-Gln-Gly-OCH₃ [2-4d] erhalten und dieses mittels *n* NaOH „titrimetrisch“ zum Acyl-Tripeptid [2-4e] verseift. Die Vereinigung von [2-4e] nach dem Carbodiimid-Hydroxysuccinimid-Verfahren²⁾ mit H-Thr(tBu)-Phe-OCH₃ [5-6h] — durch Verknüpfung von Z-Thr(tBu)-OH [5c] und H-Phe-OCH₃ [6f] und anschließende hydrogenolytische Entacylierung des erhaltenen Z-Thr(tBu)-Phe-OCH₃ [5-6g] zugänglich und als Hydrochlorid in kristalliner Form isoliert — erbrachte in hoher Ausb. Z-Ser(tBu)-Gln-Gly-Thr(tBu)-Phe-OCH₃ [2-6a]. Schonende alkalische Hydrolyse von [2-6a] führte zum Benzylxycarbonylpentapeptid [2-6b], dessen Behandlung mit katalytisch erregtem Wasserstoff zum „freien“ Pentapeptid [2-6c] (s. Schema).

¹⁾ XV. Mittell.: E. Wünsch, A. Zwick und A. Fontana, Chem. Ber. 101, 326 (1968), vorstehend.

²⁾ E. Wünsch und F. Drees, Chem. Ber. 99, 110 (1966); F. Weygand, D. Hoffmann und E. Wünsch, Z. Naturforsch. 21b, 426 (1966).



Da bei Peptidsynthesen der Einsatz von Kopfkomponenten mit N^{im} -ungeschützten Histidin-Resten in der Sequenz generell Schwierigkeiten bereitet – möglicherweise liegt darin der Grund für das Scheitern oben genannter Azidverknüpfung –, schien uns für den Anbau des amino-endständigen Histidins an das Pentapeptid [2-6c] ein N^{α} , N^{im} -diblockiertes Histidin-Derivat zweckmäßig. Aus verschiedenen Gründen, hauptsächlich jedoch wegen der durch Protonensolvolyse möglichen Demaskierung, haben wir uns für das von Haas und Mitarbb.³⁾ erstmals beschriebene N^{α} , N^{im} -Bisadamantylloxycarbonyl-L-histidin [1d] entschieden.

Mit Hilfe von AdOC-His(AdOC)-OSU [1e], auf übliche Weise aus [1d] zugänglich, verläuft der Anbau der „Sequenz-Position 1“ an das Pentapeptid [2-6c] erfolgreich; chromatographisch und analytisch reines AdOC-His(AdOC)-Ser(tBu)-Gln-Gly-Thr(tBu)-Phe-OH [1-6a] konnte in 80proz. Ausbeute isoliert werden.

³⁾ W. L. Haas, E. V. Krumkalns und K. Gerzon, J. Amer. chem. Soc. **88**, 1988 (1966).

Unseren technischen Assistenten Fräulein *B. Bouschka*, Herrn *O. Kraus* und *J. Musiol* (präparative Arbeiten) sowie Fräulein *R. Scharf* (analytische Arbeiten) danken wir für ihre ausgezeichnete Mitarbeit. Ferner danken wir der Belegschaft des mikroanalytischen Laboratoriums der Abteilung (Leitung *W. Beck*) für die Ausführung der Elementaranalysen.

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 üblichen Verfahren der Papier- und Dünnschichtchromatographie jeweils mindestens mit zwei Lösungsmittelsystemen*).

1. *Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-phenylalanin-methylester* [5-6g]: Zu einer Lösung von 70 g (226 mMol) *Z-Thr(tBu)-OH* [5c]**) in 500 ccm Dichlormethan werden bei -5° nacheinander 31.4 ccm *Triäthylamin*, 49 g (227 mMol) *H-Phe-OCH₃·HCl* [6f·HCl] und 51 g (248 mMol) *Dicyclohexylcarbodiimid* gegeben. Man rührt 4 Stdn. bei -5° und weitere 10 Stdn. bei Raumtemp. Das Filtrat vom Dicyclohexylharnstoff wird i. Vak. eingedampft, der Rückstand zwischen Essigester und Wasser verteilt, die abgetrennte organische Phase wie üblich mit verd. Citronensäure-, Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Eindampfen i. Vak. erhält man ein Öl, das mehrere Stdn. i. Hochvak. getrocknet wird. Ausb. 80.0 g (75%).

2. *O-tert.-Butyl-L-threonyl-L-phenylalanin-methylester-hydrochlorid* [5-6h·HCl]: 80.0 g (170 mMol) öliges *Z-Thr(tBu)-Phe-OCH₃* [5-6g] in 400 ccm Methanol werden wie üblich unter Zutropfen von *n* methanol. Salzsäure bei pH 4 hydriert. Das Filtrat vom Katalysator wird i. Vak. eingengt und der Rückstand aus Methanol/Diäthyläther umkristallisiert: Schmp. 162–163°; $[\alpha]_D^{20}$: $+26.6 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{246}^{20}$: $+33.1^\circ$ ($c = 1.3$; in Äthanol). Chromatographisch rein in *tert.-Butylalkohol*/Eisessig/Wasser/Pyridin (30 : 6 : 24 : 20) bzw. *tert.-Butylalkohol*/Eisessig/Wasser (6 : 2 : 2). Ausb. 59.1 g (93%).

$C_{18}H_{29}N_2O_4$]Cl (372.9) Ber. C 57.98 H 7.84 N 7.51 Gef. C 57.79 H 7.85 N 7.31

3. *Benzyloxycarbonyl-L-glutaminyll-glycin-methylester* [3-4c]: Zu 84.0 g (0.3 Mol) *Z-Gln-OH* [3] und 41.7 ccm *Triäthylamin* in 400 ccm Tetrahydrofuran/Acetonitril (1 : 1) werden bei -15° langsam unter Rühren 28.6 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* getropft. Dann fügt man 37.8 g (ca. 0.3 Mol) *H-Gly-OCH₃·HCl* [4c·HCl] und 41.7 ccm *Triäthylamin* in 200 ccm Dimethylformamid zu, rührt 1 Stde. bei -10° und weitere 4 Stdn. bei Raumtemp. Danach destilliert man die Lösungsmittel i. Vak. ab. Der Rückstand wird mit 1000 ccm 0.5*n* HCl behandelt, das gebildete feste Material abfiltriert, anschließend mit 0.5*n* $KHCO_3$ -Lösung digeriert, erneut auf das Filter gebracht und mit Wasser gut gewaschen. Das i. Vak. über P_2O_5 getrocknete Produkt kristallisiert aus Methanol mit Schmp. 174.5–175.5°; $[\alpha]_D^{20}$: $-16.2 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{246}^{20}$: -18.8° ($c = 0.8$; in Äthanol); $[\alpha]_D^{20}$: $-6.6 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{246}^{20}$: -7.7° ($c = 1$; in Eisessig). Ausb. 80.3 g (76%).

$C_{16}H_{21}N_3O_6$ (351.4) Ber. C 54.70 H 6.02 N 11.96 Gef. C 54.48 H 6.11 N 11.71

4. *L-Glutaminyll-glycin-methylester-hydrochlorid* [3-4d·HCl]: Eine Aufschlammung von 88.0 g (235 mMol) *Z-Gln-Gly-OCH₃* [3-4c] in 400 ccm Methanol wird in Gegenwart von Palladiumschwarz und unter Zutropfen von *n* methanol. Salzsäure bei pH 4 12 Stdn. wie üblich hydriert. Das Filtrat vom Katalysator wird i. Vak. eingedampft, der Rückstand aus

* Die Angabe von Lösungsmittelsystemen erfolgt nur dann, wenn damit auch eine einwandfreie Trennung von den Ausgangsmaterialien möglich ist.

** Freigesetzt aus dem Dicyclohexylammoniumsalz.

absol. Äthanol umkristallisiert: Schmp. 110—113°; $[\alpha]_D^{20}$: +16.6 ± 1° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: +19.3° ($c = 2.3$; in Methanol). Ausb. 56.3 g (94.5%).

$C_8H_{16}N_3O_4Cl$ (253.7) Ber. C 37.87 H 6.36 Cl 13.98 N 16.56
Gef. C 37.66 H 6.32 Cl 13.97 N 16.38

5. *Benzoyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutaminyglycin-methylester* [2-4d]: Zu 62.5 g (212 mMol) *Z-Ser(tBu)-OH* [2c]⁴⁾ und 29.4 ccm *Triäthylamin* in 400 ccm Tetrahydrofuran werden bei -10° unter Rühren 20.2 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* getropft und zur erhaltenen Lösung des asymm. *Anhydrids* 53.6 g (212 mMol) *H-Gln-Gly-OCH₃·HCl* [3-4d·HCl] und 29.4 ccm *Triäthylamin* in 300 ccm *Dimethylformamid* gegeben. Man rührt 1 Stde. bei -10°, dann 2 Stdn. bei Raumtemp. und dampft anschließend i. Vak. ein. Der Rückstand wird mit verd. Citronensäure-Lösung behandelt, das gebildete feste Produkt auf das Filter gebracht, mit Wasser säurefrei gewaschen, i. Vak. über P_2O_5 getrocknet und aus Äthanol umkristallisiert: Schmp. 185—186°; $[\alpha]_D^{20}$: -9.2 ± 0.5° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -10.7° ($c = 1.6$; in Äthanol); $[\alpha]_D^{30}$: -15.6 ± 1° bzw. $[\alpha]_{546}^{30}$: -18.9° ($c = 1$; in 80proz. Essigsäure), nach Trocknen bei 90°/10⁻³ Torr. Chromatographisch rein in *n*-Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35 : 35 : 30). Ausb. 83.6 g (80%).

$C_{23}H_{34}N_4O_8$ (494.6) Ber. C 55.86 H 6.93 N 11.33 Gef. C 55.68 H 7.01 N 11.35

6. *Benzoyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutaminyglycin* [2-4e]: 32.7 g (66 mMol) *Z-Ser(tBu)-Gln-Gly-OCH₃* [2-4d] in 150 ccm Dioxan werden mit 66 ccm *n NaOH* wie üblich verseift. Nach Ansäuern mit 66 ccm *n H₂SO₄* wird die Lösung i. Vak. bis zur Trockene eingedampft und der Rückstand mit Aceton behandelt, wobei Natriumsulfat ungelöst bleibt. Das i. Vak. eingedampfte Filtrat hinterläßt einen festen Rückstand, der aus wenig Wasser umkristallisiert wird: Schmp. 158—159° (145°); $[\alpha]_D^{30}$: -9.0 ± 1° bzw. $[\alpha]_{546}^{30}$: -10.3° ($c = 1.2$; in Äthanol). Chromatographisch rein in *tert*-Butylalkohol/Eisessig/Wasser/Pyridin (30 : 6 : 24 : 20). Ausb. 29.2 g (90%).

$C_{22}H_{32}N_4O_8 \cdot \frac{1}{2}H_2O$ (489.5) Ber. C 53.98 H 6.80 N 11.43 Gef. C 54.06 H 6.89 N 11.39

7. *Benzoyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutaminyglycyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-phenylalanin-methylester* [2-6a]: Zu 42.2 g (88 mMol) *Z-Ser(tBu)-Gln-Gly-OH* [2-4e] und 12.25 ccm *Triäthylamin* in 300 ccm *Dimethylformamid* werden bei -5° 32.9 g (88 mMol) *H-Thr(tBu)-Phe-OCH₃·HCl* [5-6h·HCl], 15.2 g (132 mMol) *N-Hydroxy-succinimid* und 20.0 g (97 mMol) *Dicyclohexylcarbodiimid* gegeben. Die Reaktionsmischung wird 4 Stdn. bei -5° und 14 Stdn. bei Raumtemp. gerührt, vom ausgefallenen *Dicyclohexylharnstoff* abfiltriert und i. Vak. eingedampft. Der erhaltene Rückstand wird nacheinander mit 5proz. Citronensäure- bzw. 10proz. Kaliumhydrogencarbonat-Lösung digeriert, auf das Filter gebracht und sorgfältig mit Wasser gewaschen. Aus 70proz. Methanol Schmp. 178.5—181.5°; $[\alpha]_D^{30}$: +5.4 ± 1° bzw. $[\alpha]_{546}^{30}$: +6.5° ($c = 1.1$; in Methanol). Chromatographisch rein in *n*-Heptan/*n*-Butanol/Eisessig (3 : 1 : 1) bzw. *n*-Propanol/Eisessigester/Wasser (7 : 1 : 2). Ausb. 65 g (93%).

$C_{40}H_{38}N_6O_{11}$ (798.9) Ber. C 60.13 H 7.32 N 10.52 O 22.03
Gef. C 60.07 H 7.28 N 10.60 O 21.99

8. *Benzoyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutaminyglycyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-phenylalanin* [2-6b]: Die Lösung von 20.0 g (25 mMol) *Z-Ser(tBu)-Gln-Gly-Thr(tBu)-Phe-OCH₃* [2-6a] in 40 ccm Dioxan wird mit 25.5 ccm *n NaOH* innerhalb 30 Min. wie üblich verseift. Nach Ansäuern mit 25.5 ccm *n HCl* entfernt man das Dioxan weitgehend i. Vak.; beim Stehenlassen der Restlösung bei +2° tritt Kristallisation ein. Das ausgefallene Produkt wird abfiltriert, über P_2O_5 i. Vak. getrocknet und schließlich aus Äthanol/Eisessigester oder

⁴⁾ E. Wünsch und A. Zwick, Chem. Ber. 99, 105 (1966).

Acetonitril umkristallisiert: Schmp. 155.5–157°; $[\alpha]_D^{20}$: $+16.7 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $+19.1^\circ$ ($c = 1$; in Methanol). Ausb. 16.3 g (83%).

$C_{39}H_{56}N_6O_{11}$ (784.9) Ber. C 59.68 H 7.19 N 10.71 O 22.42
Gef. C 59.67 H 7.33 N 10.62 O 22.47

9. *O*-tert.-Butyl-L-seryl-L-glutaminyglycyl-*O*-tert.-butyl-L-threonyl-L-phenylalanin [2-6c]: 15.7 g (20 mMol) *Z*-Ser(*t*Bu)-Gln-Gly-Thr(*t*Bu)-Phe-OH [2-6b] in 300 ccm wäbr. Methanol und 1 ccm Essigsäure werden wie üblich hydrogenolytisch entacyliert. Das Filtrat vom Katalysator hinterläßt nach Eindampfen i. Vak. einen Rückstand, der aus Methanol/Propanol-(2)/Diäthyläther kristallisiert: $[\alpha]_D^{20}$: $+7.33 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $+9.13^\circ$ ($c = 0.9$; in Wasser). Chromatographisch rein in tert.-Butylalkohol/Eisessig/Wasser (4:1:5) bzw. Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30). Ausb. 10.85 g (80%).

$C_{31}H_{50}N_6O_9 \cdot 1.5 H_2O$ (677.8) Ber. C 54.96 H 7.86 N 12.41 O 24.71
Gef. C 54.94 H 8.07 N 12.48 O 25.03

10. *N*^a.*N*^{im}-Bis-adamantylloxycarbonyl-L-histidin-[*N*-hydroxy-succinimidester] [1e]: 25.6 g *AdOC*-His(*AdOC*)-OH [1d]³⁾ und 7.0 g *N*-Hydroxy-succinimid in 250 ccm Dioxan werden bei 0° mit 11 g Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Dann wird 2 Stdn. bei 0° und 12 Stdn. bei Raumtemp. gerührt, nach erneutem Abkühlen auf 0° vom abgeschiedenen Dicyclohexylharnstoff filtriert und der nach Eindampfen des Filtrats i. Vak. erhaltene Rückstand mit 100 ccm Dichlormethan behandelt, wobei geringe Mengen Dicyclohexylharnstoff ungelöst bleiben. Die erwärmte Dichlormethan-Lösung versetzt man vorsichtig mit wenig Petroläther; nach Einsetzen der Kristallisation wird mit Petroläther überschichtet und zuerst bei Raumtemp. und anschließend bei -5° zur Vervollständigung der Kristallisation stehengelassen. Das abfiltrierte Produkt wird i. Vak. bei 60° getrocknet: Schmp. 164.5–167.5° (151°). Ausb. 22.6 g. (Das erhaltene *AdOC*-His(*AdOC*)-OSU enthält noch etwas *N*-Hydroxy-succinimid, ist jedoch für die weitere Umsetzung genügend rein.)

11. *N*^a.*N*^{im}-Bis-adamantylloxycarbonyl-L-histidyl-*O*-tert.-butyl-L-seryl-L-glutaminyglycyl-*O*-tert.-butyl-L-threonyl-L-phenylalanin [1-6a]: 6.78 g (1 mMol) *H*-Ser(*t*Bu)-Gln-Gly-Thr(*t*Bu)-Phe-OH [2-6c] und 1.4 ccm Triäthylamin in 150 ccm Pyridin werden bei -5° mit 9.2 g (ca. 1.5 mMol) *AdOC*-His(*AdOC*)-OSU [1e] (Rohprodukt) versetzt; die Reaktionslösung wird 2 Stdn. bei 0° und weitere 8 Stdn. bei Raumtemp. gerührt, i. Vak. eingedampft, der Rückstand mit absol. Diäthyläther behandelt und auf das Filter gebracht. Die Lösung des erhaltenen Produktes in 100 ccm Methanol läßt man in 500 ccm Wasser, das 4.3 g Citronensäure enthält, einfließen. Die gebildete Fällung wird abfiltriert, nach sorgfältigem Waschen mit Wasser i. Vak. getrocknet und schließlich in 300 ccm Essigester/Methanol (5:1) aufgenommen. In diese Lösung läßt man unter Rühren 100 ccm absol. Diäthyläther langsam einfließen. Nach mehrstdg. Stehenlassen im Kühlschrank bei -5° wird der Niederschlag abfiltriert und i. Vak. bei 40° getrocknet*): $[\alpha]_D^{20}$: $+16.63 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $+19.94^\circ$ ($c = 0.9$; in Methanol). Chromatographisch rein in Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30), *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (6:2:2) bzw. *n*-Heptan/*n*-Butanol/Eisessig (1:2:1). Ausb. 9.45 g (80%).

$C_{59}H_{85}N_9O_{14} \cdot CH_3OH$ (1176.4) Ber. C 61.26 H 7.63 N 10.72 O 20.40
Gef. C 60.90 H 7.87 N 10.87 O 20.33

Aminosäureanalyse:

	His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	NH ₃
Ber.	1	1	1	1	1	1	1
Gef.	0.96	0.96	1.0	1.0	1.0	0.96	1.21

*) Beim Umkristallisieren aus Acetonitril und Trocknen der Fällung bei 60°/10⁻³ Torr erhält man das Acyl-hexapeptid mit 1 Mol. Wasser und 1/2 Mol. Acetonitril.

$C_{59}H_{85}N_9O_{14} \cdot H_2O \cdot 1/2 CH_3CN$ (1182.9) Ber. C 60.92 H 7.54 N 11.25 O 20.29
Gef. C 60.88 H 7.61 N 11.24 O 20.09