

Erich Wünsch und Paul Thamm

Zur Synthese des Sekretins, III<sup>1)</sup>

## Darstellung der Sequenz 7–11

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

(Eingegangen am 21. April 1971)

Die Synthese von Benzyloxycarbonyl- bzw. 2-Nitro-phenylsulfenyl-*O*-tert.-butyl-L-threonyl-*O*-tert.-butyl-L-seryl-L-glutamyl( $\gamma$ -tert.-butylester)-L-leucyl-*O*-tert.-butyl-L-serin, eines zur Verknüpfung mit der früher synthetisierten Sequenz 12–27 als Kopfkomponente geeigneten Teilstücks des Sekretins mit der Aminosäurefolge 7–11, wird beschrieben.

### The Synthesis of Secretin, III<sup>1)</sup>

#### Preparation of the Sequence 7–11

The synthesis of benzyloxycarbonyl- or 2-nitrophenylsulfenyl-*O*-tert-butyl-L-threonyl-*O*-tert-butyl-L-seryl-L-glutamyl( $\gamma$ -tert-butylester)-L-leucyl-*O*-tert-butyl-L-serine is described. This overall side-chain protected *N*-acyl fragment 7–11 of secretin is designed for further coupling with fragment 12–27, which is described in the preceding paper.

In der vorstehenden Mitteilung<sup>1)</sup> haben wir eine brauchbare Synthese für die Sekretin-Teilsequenz 12–27 (= Fragment II) aufgezeigt. In vorliegender Arbeit soll nun über eine „verknüpfungsfähige“ Sekretin-Teilsequenz 7–11 berichtet werden, die später als „Fragment III“ mit Fragment II zu der Sekretin-Teilsequenz 7–27 vereinigt werden soll.

H-Ser(tBu)-OMe·HCl [11·HCl]<sup>2)</sup> wurde mit Z-Leu-OH [10] nach dem Hydroxy-succinimidester-Verfahren zum Acyl-dipeptid-ester [10-11a] kondensiert und das ölig anfallende Material ohne nähere Charakterisierung sofort zu Z-Leu-Ser(tBu)-OH [10-11b] verseift; dessen hydrogenolytische Entacylierung führte zum freien, *O*-geschützten Dipeptid [10-11c].

Ausgehend von diesem Dipeptid [10-11c] wurde in stufenweisem Anbauverfahren unter Verwendung von Z-Glu(OtBu)-OSU [9]<sup>3)</sup>, Z-Ser(tBu)-OSU [8] und Z-Thr(tBu)-OSU [7a] bzw. NPS-Thr(tBu)-OSU [7b]<sup>4)</sup> das Benzyloxycarbonyl-[7-11a] bzw. 2-Nitro-phenylsulfenyl-pentapeptid-Derivat [7-11b] hergestellt (s.

<sup>1)</sup> II. Mittel.: E. Wünsch, G. Wendlberger und P. Thamm, Chem. Ber. **104**, 2445 (1971), vorstehend.

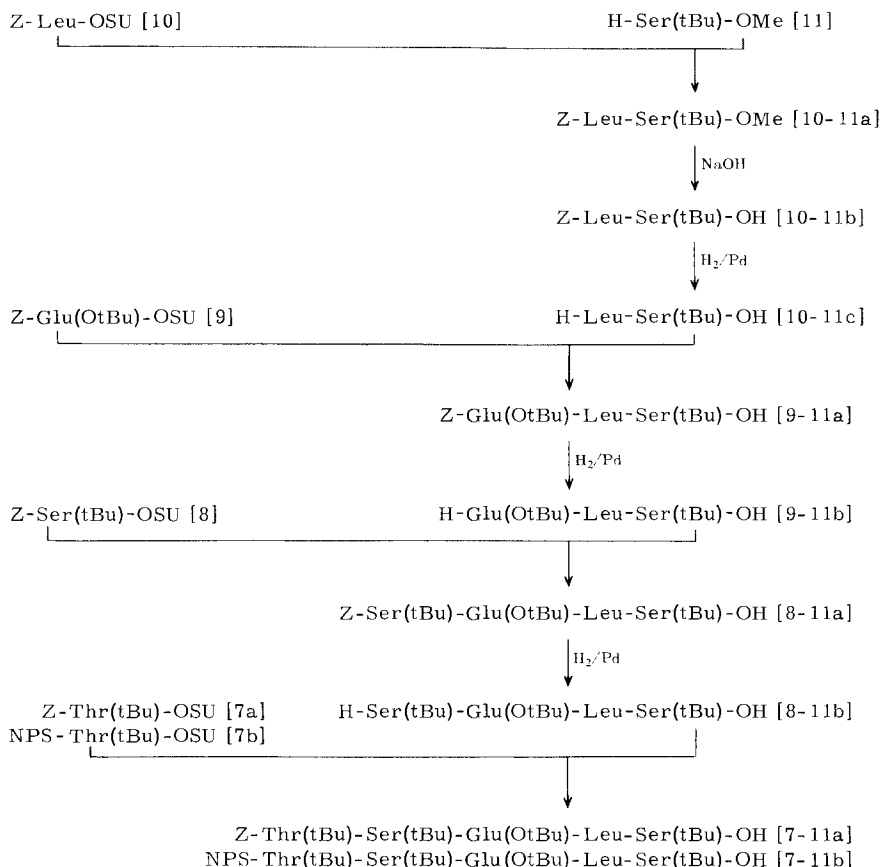
<sup>2)</sup> E. Wünsch, A. Zwick und A. Fontana, Chem. Ber. **101**, 326 (1968).

<sup>3)</sup> R. Zabel und H. Zahn, Z. Naturforsch. **20b**, 650 (1965).

<sup>4)</sup> E. Wünsch und A. Fontana, Chem. Ber. **101**, 323 (1968).

Schema). Die beiden Verbindungen konnten basierend auf H-Leu-Ser(tBu)-OH [10-11c] jeweils in etwa 45proz. Ausbeute (über alle Stufen) in chromatographisch und analytisch reiner Form erhalten werden.

Synthese der Sekretin-Teilsequenz 7-11



Den *Farbwerken Hoechst AG* sind wir wiederum für umfangreiche finanzielle und materielle Unterstützung zu hohem Dank verpflichtet. Ebenfalls danken wir der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für eine Beihilfe im Rahmen des Schwerpunktprogramms „Synthese makromolekularer Naturstoffe“.

Herrn *O. Kraus* sind wir für seine vorbildliche Mitarbeit zu Dank verpflichtet; Fräulein *R. Scharf* gebührt unser Dank für die Ausführung der Aminosäureanalysen, Herrn *W. Beck* (Leiter des mikroanalytischen Labors der Abteilung) für die Bestimmung der Elementaranalysenwerte.

## Beschreibung der Versuche

Allgemeines s. II. Mitteil.<sup>1)</sup>.

1. *Benzylloxycarbonyl-L-leucyl-O-tert.-butyl-L-serin-methylester* [10-11a]: 75 g (0.27 Mol) öliges *Z-Leu-OH* [10], 35 g *N-Hydroxy-succinimid* und 63 g *Dicyclohexylcarbodiimid* in 500 ccm Essigester werden bei 0° über Nacht gerührt. Das Filtrat vom Dicyclohexylharnstoff wird unter Eiskühlung mit 50.2 g (0.24 Mol) *H-Ser(tBu)-OMe·HCl* [11·HCl]<sup>2)</sup> und 33.3 ccm Triäthylamin versetzt und die Mischung 2 Tage bei Raumtemp. gerührt. Auf Zugabe von 10 ccm *N*-[2-Amino-äthyl]-piperazin wird nochmals 1 Stde. gerührt, filtriert und i. Vak. eingedampft. Die Lösung des Rückstands in Äther wird wie üblich mit verd. Schwefelsäure und Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und schließlich i. Vak. bis zur Gewichtskonstanz eingedampft: Ausb. 100 g Öl (quantitat.).

2. *Benzylloxycarbonyl-L-leucyl-O-tert.-butyl-L-serin* [10-11b]: 100 g nach 1. erhaltenes *Z-Leu-Ser(tBu)-OMe* [10-11a] in 500 ccm Dioxan und 20 ccm Wasser werden wie üblich titrimetrisch mit 2*n* NaOH verseift und aufgearbeitet. Aus Äther/Petroläther farblose Kristalle vom Schmp. 128–129° (Umwandlungsprodukt bei 112°);  $[\alpha]_D^{20}$ : +11.7° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : +14.0° (*c* = 5.5, in Äthanol). Chromatographisch rein in Cyclohexan/Chloroform/Eisessig (45 : 45 : 10). Ausb. 83 g (86%).

$C_{21}H_{32}N_2O_6$  (408.5) Ber. C 61.74 H 7.90 N 6.86 O 23.50

Gef. C 61.45 H 8.05 N 7.00 O 23.79

3. *L-Leucyl-O-tert.-butyl-L-serin* [10-11c]: 83.0 g *Z-Leu-Ser(tBu)-OH* [10-11b] in 750 ccm Methanol und 75 ccm Wasser werden wie üblich hydrogenolytisch entacyliert, das Filtrat wird i. Vak. zur Trockne gebracht. Der erhaltene Rückstand kristallisiert aus wenig Methanol:  $[\alpha]_D^{20}$ : +33.2° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : +39.9° (*c* = 4.4, in Wasser). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/. Eisessig/Wasser/Pyridin (60 : 6 : 24 : 20). Ausb. 51.5 g (88%).

$C_{13}H_{26}N_2O_4 \cdot H_2O$  (292.4) Ber. C 52.76 H 9.67 N 9.46 O 28.11

Gef. C 52.60 H 9.64 N 9.49 O 28.09

4. *Benzylloxycarbonyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-leucyl-O-tert.-butyl-L-serin* [9-11a]: 36.2 g nach 3. erhaltenes *H-Leu-Ser(tBu)-OH* [10-11c] und 64.5 g *Z-Glu(OtBu)-OSU* [9]<sup>3)</sup> in 500 ccm Dimethylformamid werden bei 0° nach Zusatz von 50 ccm Pyridin und 13.3 ccm *N*-Methyl-morpholin 2 Tage, nach Zugabe von 3.2 ccm *N*-[2-Amino-äthyl]-piperazin noch 1 Stde. gerührt. Danach wird das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert und der Rückstand zwischen Essigester und sehr verd. Schwefelsäure verteilt. Die abgetrennte organische Phase wird mit Wasser sulfatfrei gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. zur Trockne gebracht. Aus Äther feine farblose Kristalle vom Schmp. 130–132°;  $[\alpha]_D^{20}$ : –10.1° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : –12.1° (*c* = 1.6, in Äthanol). Ausb. 59 g (80%).

$C_{30}H_{47}N_3O_9$  (593.7) Ber. C 60.69 H 7.98 N 7.08 O 24.25

Gef. C 60.64 H 8.05 N 7.14 O 24.28

5. *L-Glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-leucyl-O-tert.-butyl-L-serin* [9-11b]: 58.5 g *Z-Glu(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-OH* [9-11a] in 1000 ccm Methanol und 100 ccm Wasser werden wie üblich mit katalytisch erregtem Wasserstoff behandelt. Das Filtrat wird zur Trockne eingedampft, der Rückstand i. Vak. über  $P_4O_{10}$  getrocknet: farbloses Pulver vom Schmp. 162–163° (Zers.);  $[\alpha]_D^{20}$ : +19.0° bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ : +22.6° (*c* = 2, in 80proz. Essigsäure). Chromatographisch rein in Isoamylalkohol/Pyridin/Wasser (35 : 35 : 30). Ausb. 47.3 g (quantitat.).

$C_{22}H_{41}N_3O_7 \cdot 1.5 H_2O$  (486.6) Ber. C 54.32 H 9.12 N 8.65 O 28.00

Gef. C 54.13 H 9.23 N 8.35 O 27.89

6. *Benzylloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-leucyl-O-tert.-butyl-L-serin* [8-11a]: 47 g wie unter 5. beschriebenes *H-Glu(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-OH*

[9-11b] und 46 g *Z-Ser(tBu)-OSU* [8] in 850 ccm Dimethylformamid werden bei 0° nach Zugabe von 50 ccm Pyridin und 10.5 ccm *N*-Methyl-morpholin 1 Tag, auf Zugabe von 2.5 ccm *N*-[2-Amino-äthyl]-piperazin noch 1 Stde. gerührt. Der nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. erhaltene Rückstand wird zwischen Essigester und sehr verd. Schwefelsäure, wie unter 4. beschrieben, verteilt und aufgearbeitet. Aus Äther feine farblose Nadelchen vom Schmp. 191—193°;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-10.7^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-13.0^\circ$  ( $c = 2.3$ , in Methanol). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser/Pyridin (60 : 6 : 24 : 20). Ausb. 60 g (84%).

$C_{37}H_{60}N_4O_{11}$  (736.9) Ber. C 60.30 H 8.20 N 7.60 O 23.89

Gef. C 60.13 H 8.29 N 7.50 O 24.24

7. *O-tert.-Butyl-L-seryl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-leucyl-O-tert.-butyl-L-serin* [8-11b]: 59 g *Z-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-OH* [8-11a] in 1000 ccm Dimethylformamid werden wie üblich hydrogenolytisch entacyliert, wobei das Reaktionsprodukt ausfällt. Es wird zusammen mit dem Katalysator aufs Filter gebracht und erschöpfend mit heißem 95proz. Methanol extrahiert. Beim Abkühlen der Auszüge auf 0° tritt Kristallisation ein. Nach Trocknen i. Hochvak. über  $P_4O_{10}$  mikrokristallines Pulver:  $[\alpha]_D^{20}$ :  $+6.2^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $+6.9^\circ$  ( $c = 1$ , in Eisessig). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (10 : 1 : 3). Ausb. 40 g (84%).

$C_{29}H_{54}N_4O_9$  (602.8) Ber. C 57.78 H 9.03 N 9.29 O 23.89

Gef. C 57.38 H 9.00 N 9.15 O 23.99

8. *Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-leucyl-O-tert.-butyl-L-serin* [7-11a]: 13.2 g *H-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-OH* [8-11b], 13.5 g *Z-Thr(tBu)-OSU* [7a] (1.5 Äquivv.) und 6.15 ccm Triäthylamin in 800 ccm Dimethylformamid werden 24 Stdn. bei Raumtemp., nach Zugabe von 2 ccm *N*-[2-Amino-äthyl]-piperazin nochmals 1 Stde. gerührt. Nach Vakuumdestillation wird der harzige Rückstand zwischen Essigester und sehr verd. Schwefelsäure, wie unter 4. beschrieben, verteilt und aufgearbeitet. Der feste Rückstand wird aus viel Essigester umkristallisiert: Schmp. 204—206°;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $+14.9^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $+18.0^\circ$  ( $c = 1.5$ , in Dimethylformamid). Chromatographisch rein in Cyclohexan/Chloroform/Eisessig (45 : 45 : 10). Ausb. 16.2 g (83%).

$C_{45}H_{75}N_5O_{13} \cdot 0.5 H_2O$  (903.1) Ber. C 59.86 H 8.48 N 7.75 O 23.93

Gef. C 59.54 H 8.53 N 7.68 O 23.78

Aminosäureanalyse: Thr Ser Glu Leu

Ber. 1.0 2.0 1.0 1.0

Gef. 1.00 2.06 1.00 1.03

9. *2-Nitro-phenylsulfenyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-L-leucyl-O-tert.-butyl-L-serin* [7-11b]: 18.1 g *H-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-OH* [8-11b], 17.8 g *NPS-Thr(tBu)-OSU* [7b]<sup>4)</sup> und 8.4 ccm Triäthylamin in 700 ccm Dimethylformamid werden 24 Stdn. bei Raumtemp., nach Zugabe von 1.9 ccm *N*-[2-Amino-äthyl]-piperazin noch 1 Stde. gerührt. Die i. Vak. auf etwa 100 ccm eingeeengte Reaktionsmischung wird in 3000 ccm 0.05 *n*  $H_2SO_4$  eingerührt, die gebildete Fällung abfiltriert und mit warmem Wasser sorgfältig digeriert. Aus der Lösung des erhaltenen Materials in 500 ccm Essigester tritt auf Äther-Zugabe Fällung ein; nach Trocknen bei 50° i. Hochvak. über  $P_4O_{10}$ : gelbes Pulver vom Schmp. 218—220° (Zers.);  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-11.9^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{546}^{20}$ :  $-14.6^\circ$  ( $c = 1.9$ , in Pyridin). Chromatographisch rein in Cyclohexan/Chloroform/Eisessig (45 : 45 : 10). Ausb. 21.5 g (79%).

$C_{43}H_{72}N_6O_{13}S \cdot 0.5 H_2O$  (922.2) Ber. C 56.00 H 7.98 N 9.12 S 3.48

Gef. C 55.95 H 8.12 N 9.11 S 3.50

[162/71]