

# CHEMISCHE BERICHTE

In Fortsetzung der

BERICHTE DER DEUTSCHEN CHEMISCHEN GESELLSCHAFT

herausgegeben von der

GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

101. Jahrg. Nr. 11

S. 3659—4014

*Erich Wünsch* und *Gerhard Wendlberger*

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

## Darstellung der Gesamtsequenz

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

(Eingegangen am 15. Mai 1968)

Die Synthese eines Nonicosapeptids mit der von *Bromer* und Mitarbb.<sup>2)</sup> für das Pankreas-Hormon Glucagon vorgeschlagenen Sequenz

H-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-  
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20  
 Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-OH  
 21 22 23 24 25 26 27 28 29

wird beschrieben, ferner die Synthese der Teilsequenz **1—23** des Hormons.

In zwei vorausgegangenen Arbeiten<sup>3,1)</sup> haben wir die Darstellung der Sequenzen **1—6** und **7—29** des Glucagons in ihrer geschützten Form beschrieben. Die Verknüpfung dieser beiden Bruchstücke

AdOC-His(AdOC)-Ser(tBu)-Gln-Gly-Thr(tBu)-Phe-OH [**1-6a**]

und

H-Thr(tBu)-Ser(tBu)-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-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(tBu)-OtBu [**7-29b**]

<sup>1)</sup> XVII. Mittel.: *E. Wünsch* und *G. Wendlberger*, Chem. Ber. **101**, 341 (1968).

<sup>2)</sup> *W. W. Bromer*, *L. G. Sinn*, *A. Staub* und *O. K. Behrens*, J. Amer. chem. Soc. **78**, 3858 (1956); *W. W. Bromer*, *A. Staub*, *E. R. Dillek*, *H. L. Bird*, *L. G. Sinn* und *O. K. Behrens*, ebenda **79**, 2794 (1957); *W. W. Bromer*, *L. G. Sinn* und *O. K. Behrens*, ebenda **79**, 2798 (1957); *W. W. Bromer*, *A. Staub*, *L. G. Sinn* und *O. K. Behrens*, ebenda **79**, 2801 (1957); *L. G. Sinn*, *O. K. Behrens* und *W. W. Bromer*, ebenda **79**, 2805 (1957); *W. W. Bromer*, *L. G. Sinn* und *O. K. Behrens*, ebenda **79**, 2807 (1957).

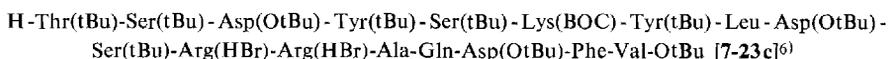
<sup>3)</sup> *E. Wünsch*, *A. Zwick* und *E. Jaeger*, Chem. Ber. **101**, 336 (1968).

gelang nunmehr einwandfrei mit Hilfe des Carbodiimid-Hydroxysuccinimid-Verfahrens in Dimethylacetamid/Phosphorsäure-tris-dimethylamid mit ca. 84proz. Ausbeute. Die Abspaltung der Schutzgruppen vom allseits maskierten Nonicosapeptid erfolgte mittels wasserfreier Trifluoressigsäure — zum Schutz der Tryptophan- bzw. Methionin-Reste unter Zusatz von Diäthylphosphit und Methyläthylsulfid bei gleichzeitigem Arbeiten unter Argon-Atmosphäre —; anschließendes Behandeln des nach Eindampfen i. Vak. erhaltenen Rückstandes mit einer wäbr. Suspension von Dowex 4 bzw. 44 in der OH-Form und letztlich Gefriertrocknung des mit Essigsäure angesäuerten Filtrats vom Ionenaustauscher führte quantitativ zu einem „Roh-Glucagon“, das in hohem Prozentsatz in den analytischen Tests, zu ca. 50% in der biologischen Aktivitätsbestimmung mit dem natürlichen Hormon übereinstimmte<sup>4)</sup>.

Zur Synthese der Glucagon-Sequenz **1–23** — der im Hinblick auf die Befunde *Bromers*<sup>5)</sup>, nach denen die Sequenz **1–23** volle biologische Hormonaktivität besitzen soll, Bedeutung zukommt — haben wir die beiden Bruchstücke



und



nach oben genannter Methode vereinigt; nach Entfernung aller Schutzgruppen mit Trifluoressigsäure und gleicher Aufarbeitung wie für die Gesamtsequenz **1–29** beschrieben, erhielten wir ein Rohprodukt, das sich an Sephadex G-25 (Elutionsmittel pyridinhaltiges Wasser (0.2%)) in die zwei Hauptfraktionen A und B auftrennen ließ. Fraktion B erwies sich als reines Tricosapeptid der Sequenz H-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-OH [**1-23b**]. Es zeigte im biologischen Test jedoch keine Aktivität. An Hand dieser Teilsequenz **1–23** konnte jedoch die Richtigkeit der von *Bromer* und Mitarbb. vorgeschlagenen Struktur des Glucagons zu einem erheblichen Teil bewiesen werden: Ein Trypsin-Abbau von synthetischem Tricosapeptid bzw. Glucagon ergab äquiv. Mengen an freiem Arginin, ein von *Weygand* und Mitarbb.<sup>7)</sup> vorgenommener *Edman*-Abbau an beiden Peptiden zeigte bis zur Sequenz **17** (1. Arginin) identische Abbau-Schritte auf.

Den *Farbwerken Hoechst AG* sind wir für umfangreiche finanzielle und materielle Unterstützung zu höchstem Dank verpflichtet. Unseren technischen Assistentinnen Frau *B. Kalix-Bouschka* und Frau *B. Röhrle-Scherer* (präparative Arbeiten) sowie Fräulein *R. Scharf* (analytische Arbeiten) danken wir für ihre ausgezeichnete Mitarbeit. Die Elementaranalysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium der Abteilung (Leitung *W. Beck*) ausgeführt.

<sup>4)</sup> Zur Reindarstellung siehe XIX. Mitteil.: Chem. Ber. **101**, 3664 (1968), nachstehend.

<sup>5)</sup> *W. W. Bromer* und *B. J. Remus*, Abstract 6<sup>th</sup> Internat. Congress of Biochemistry, Teil II-24, New York 1964.

<sup>6)</sup> *E. Wünsch, A. Zwick* und *A. Fontana*, Chem. Ber. **101**, 326 (1968).

<sup>7)</sup> Herrn Prof. *Weygand* danken wir für die vorgenommenen Untersuchungen.

## Beschreibung der Versuche

Der chromatographische Reinheitstest der Zwischen- und Endprodukte erfolgte nach üblichen Verfahren der Papier- und Dünnschichtchromatographie jeweils mindestens mit zwei Lösungsmittelsystemen.

1.  $N^{\alpha}$ -*N*<sup>im</sup>-Bis-adamantylloxycarbonyl-L-histidyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutaminyl-glycyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-asparagyl-( $\beta$ -tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N<sup>e</sup>-tert.-butylloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparagyl( $\beta$ -tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-seryl-L-arginyl(hydrobromid)-L-arginyl(hydrobromid)-L-alanyl-L-glutaminyll-L-asparagyl( $\beta$ -tert.-butylester)-L-phenylalanyl-L-valyl-L-glutaminyll-L-tryptophyl-L-leucyl-L-methionyl-L-asparaginyll-O-tert.-butyl-L-threonin-tert.-butylester [1-29 a]

Eine Lösung von 1.90 g *H-Thr(tBu)-Ser(tBu)-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-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(tBu)-OtBu* · HBr [7-29 b · HBr] und 2.36 g *AdOC-His(AdOC)-Ser(tBu)-Gln-Gly-Thr(tBu)-Phe-OH* [1-6 a] und 0.345 g *N-Hydroxy-succinimid* in 40 ccm frisch destilliertem Dimethylacetamid/Phosphorsäure-tris-dimethylamid (1:1) wird mit 0.07 ccm Triäthylamin versetzt, auf  $-15^{\circ}$  abgekühlt, nach Zugabe von 0.618 g *Dicyclohexylcarbodiimid* 24 Stdn. bei  $0-5^{\circ}$  und weitere 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Danach gibt man nochmals 0.6 g *AdOC-His(AdOC)-Ser(tBu)-Gln-Gly-Thr(tBu)-Phe-OH* [1-6 a], 0.06 g *N-Hydroxy-succinimid* und 0.103 g *Dicyclohexylcarbodiimid* zu und rührt den Ansatz weitere 2 Tage. Man erwärmt 30 Min. auf  $60^{\circ}$ , filtriert und dampft anschließend Dimethylacetamid bei  $50^{\circ}/10^{-2}$  Torr ab; die verbleibende Lösung läßt man in 1.5 l absol. Äther einfließen. Nach 3 Stdn. wird der Niederschlag abfiltriert und mit absol. Äther sorgfältig nachgewaschen. Das Produkt wird 3 mal mit heißem Essigester und anschließend 2 mal mit bidest. Wasser digeriert, i. Vak. kurz getrocknet und schließlich 17 Stdn. im Soxhlet-Apparat mit absol. Tetrahydrofuran erschöpfend extrahiert. Nach 15stdg. Trocknen bei  $80^{\circ}/10^{-2}$  Torr über  $P_2O_5$  resultieren 2.06 g (84%) als farbloses amorphes Pulver.

$C_{232}H_{367}N_{43}O_{55}S]Br_2 \cdot 6 H_2O$  (4938.8) Ber. C 56.42 H 7.74 N 12.20 O 19.76  
Gef. C 55.91 H 7.39 N 12.31 O 19.61

Aminosäureanalyse:

	His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Asp	Tyr	Lys	Leu	Arg
Ber.	1	4	3	1	3	2	4	2	1	2	2
Gef.	0.98	3.95	3.06	1.04	2.89	2.05	4.06	1.87	1.02	2.05	1.91
	Ala	Val	Trp	Met							
Ber.	1	1	1	1							
Gef.	1.01	1.04	—	1.05							

2. *L-Histidyl-L-seryl-L-glutaminyl-glycyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-L-seryl-L-asparagyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-lysyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparagyl-L-seryl-L-arginyl-L-arginyl-L-alanyl-L-glutaminyll-L-asparagyl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-glutaminyll-L-tryptophyl-L-leucyl-L-methionyl-L-asparaginyll-L-threonin* [1-29 b] („Roh-Glucagon“)

0.97 g (0.2 mMol) *AdOC-His(AdOC)-Ser(tBu)-Gln-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-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-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(tBu)-OtBu* [1-29 a] werden mit 20 ccm frisch dest. *Trifluoressigsäure* sowie 2 ccm frisch dest. *Diäthylphosphit* und 2 ccm *Methyläthylsulfid* übergossen. Das Reaktionsgemisch wird unter Aufleiten eines schwachen Argon-Stroms und vor Licht geschützt ca. 2 Stdn. sich selbst überlassen, anschließend i. Vak.

bei  $10^{-2}$  Torr/ $15^{\circ}$  Badtemperatur zum Sirup eingedampft. Der erhaltene Rückstand wird mit absol. Äther digeriert, das festgewordene Material abfiltriert, mit absol. Äther gewaschen und i. Vak. getrocknet. Es wird anschließend in eine wäbr. Suspension von *Dowex 4* (OH<sup>-</sup>-Form) eingetragen. Nach Versetzen mit wenig Essigsäure rührt man die Mischung noch 1 Stde. lang, filtriert vom Austauscher-Harz und lyophilisiert die erhaltene Lösung. Ausb. 750 mg.

## Aminosäureanalyse:

	His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Asp	Tyr	Lys	Leu	Arg
Ber.	1	4	3	1	3	2	4	2	1	2	2
Gef.	0.98	4.02	3.05	1.10	2.95	2.03	3.83	1.94	1.01	2.01	2.03
	Ala	Val	Trp	Met							
Ber.	1	1	1	1							
Gef.	1.04	1.02	—	1.01							

3. *N<sup>α</sup>,N<sup>β</sup>-Bis-adamantylloxycarbonyl-L-histidyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutaminyglycyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-asparagyl-(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N<sup>ε</sup>-tert.-butylloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-seryl-L-arginyl(hydrobromid)-L-arginyl(hydrobromid)-L-alanyl-L-glutaminy-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-L-phenylalanyl-L-valin-tert.-butylester [1-23a]*

3.45 g *AdOC-His(AdOC)-Ser(tBu)-Gln-Gly-Thr(tBu)-Phe-OH [1-6a]* und 4.28 g *H-Thr(tBu)-Ser(tBu)-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 [7-23c]* in 300 ccm Dimethylformamid/Phosphorsäure-tris-dimethylamid werden bei  $-20^{\circ}$  mit 0.75 g *N-Hydroxy-succinimid* und 0.6 g *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt. Die Reaktionsmischung wird 52 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt und anschließend i. Vak. auf die Hälfte eingedampft (DMF). Die Restlösung läßt man unter Rühren in 2 l Petroläther/Äther (5:1) einfließen; man dekantiert die überstehende Lösung ab und nimmt die verbleibende schmierige Masse in heißem Methanol auf (kleine Reste bleiben als gallertige Rückstände erhalten). Nach erneutem Eindampfen i. Vak. wird der Rückstand mit Wasser behandelt; das festgewordene Produkt wird abfiltriert und i. Vak. über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet. Das so erhaltene Material wird im Soxhlet-Apparat mit 500 ccm absol. Tetrahydrofuran 12 Stdn. erschöpfend extrahiert. Das verbleibende Material wird bei  $10^{-2}$  Torr getrocknet. Ausb. 5.1 g (ca. 87%).

$C_{193}H_{308}N_{34}O_{46}]Br_2 \cdot 2 H_2O$  (4036.7) Ber. C 57.43 H 7.79 N 11.80  
Gef. C 57.18 H 7.89 N 11.72

## Aminosäureanalyse:

	His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Asp	Tyr	Lys	Leu	Arg	
Ber.	1	4	2	1	2	2	3	2	1	1	2	
Gef.	1.05	3.53	2.08	1.13	1.98	2.07	2.93	1.81	1.04	0.98	1.94	
	Ala	Val	NH <sub>3</sub>									
Ber.	1	1	2									
Gef.	1.00	0.95	3.05									

4. *L-Histidyl-L-seryl-L-glutaminyglycyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-L-seryl-L-asparagyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-lysyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparagyl-L-seryl-L-arginyl-L-arginyl-L-alanyl-L-glutaminy-L-asparagyl-L-phenylalanyl-L-valin [1-23b]*

2.0 g *AdOC-His(AdOC)-Ser(tBu)-Gln-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-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 [1-23a]* werden mit 40 ccm wasserfreier *Trifluoressigsäure* über-

gossen und 2 Stdn. bei Raumtemp. stehengelassen; hierbei erfolgt Lösung. Anschließend wird die Trifluoressigsäure bei  $10^{-2}$  Torr und maximal  $15^{\circ}$  Badtemp. abgezogen, der verbleibende Rückstand aufgearbeitet, wie unter 2. beschrieben: Ausb. 1.32 g farbloses amorphes Pulver.

500 mg des erhaltenen gefriergetrockneten Rohprodukts in 25 ccm Wasser werden auf eine Sephadex G 25-Säule ( $4 \times 150$  cm) aufgebracht. Eluiert wird anschließend mit pyridinhaltigem Wasser (0.2%); Durchlaufgeschwindigkeit 45 ccm/Stde.; Ausmessung mittels UV-Absorption (Uvicord bei 254 nm). Nach 700 ccm Eluat, das eine undefinierte Vorfraktion enthielt, wurde die Hauptmenge des *reinen Tricosapeptids* in der Fraktion 33—42 (220 ccm) aufgefangen und anschließend lyophilisiert: Ausb. 310 mg farbloses amorphes Pulver.

Aminosäureanalyse:

	His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Asp	Tyr	Lys	Leu	Arg	
Ber.	1	4	2	1	2	2	3	2	1	1	2	
Gef.	0.93	3.53	2.04	1.07	1.94	2.01	2.95	1.85	0.99	0.99	1.91	
	Ala	Val	NH <sub>3</sub>									
Ber.	1	1	2									
Gef.	1.00	0.96	2.78									

Quantitative Arginin-Bestimmung nach Trypsin-Abbau im Vergleich mit natürlichem Glucagon:

Natürliches Glucagon	0.46 mMol Arginin
Tricosapeptid	0.44 mMol Arginin

Abbau mit Aminopeptidase M: 100proz. Spaltung.

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Asp	Tyr	Lys	Leu	Arg	Ala	Val
1.00	3.92	2.05	1.00	2.02	2.04	2.88	1.81	0.99	1.00	2.06	1.08	1.09

[196/68]