

Erich Wünsch, Ernst Jaeger und Regina Scharf

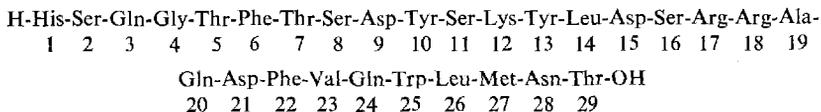
Zur Synthese des Glucagons, XIX<sup>1)</sup>

## Reindarstellung des synthetischen Glucagons

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

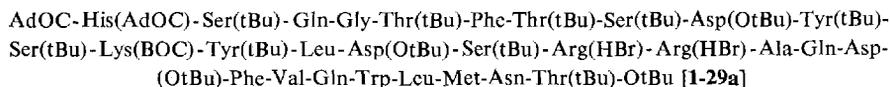
(Eingegangen am 15. Mai 1968)

Die Reindarstellung des Nonicosapeptids



aus dem durch Trifluoressigsäure-Demaskierung des allseits geschützten Nonicosapeptidderivates erhaltenen Roh-Glucagon<sup>1,2)</sup> gelingt zweckmäßig durch Gelfiltration an Sephadex G-50. Das durch Gefriertrocknung erhaltene amorphe Produkt kristallisiert analog dem natürlichen Hormon aus wäbr. Lösung nahe dem isoelektrischen Punkt. Das so gewonnene synthetische Glucagon ist in allen getesteten Eigenschaften (Kristallform, Aminosäurezusammensetzung nach saurer und enzymatischer Hydrolyse, chromatographischem und elektrophoretischem Verhalten, UV- und IR-Spektrum, optischer Rotationsdispersion) mit dem Naturstoff identisch; es zeigt ferner die volle biologische Aktivität. Die von *Bromer* und *Mit-arrb.*<sup>3)</sup> vorgeschlagene Struktur für das Pankreas-Hormon Glucagon ist damit bewiesen.

In der vorhergehenden Mitteilung<sup>1)</sup> haben wir die Darstellung von „Roh-Glucagon“ [1-29b] durch Trifluoressigsäure-Solvolyse von



beschrieben. Gestützt auf die Erfahrungen bei der Synthese des reinen Tricosapeptids 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

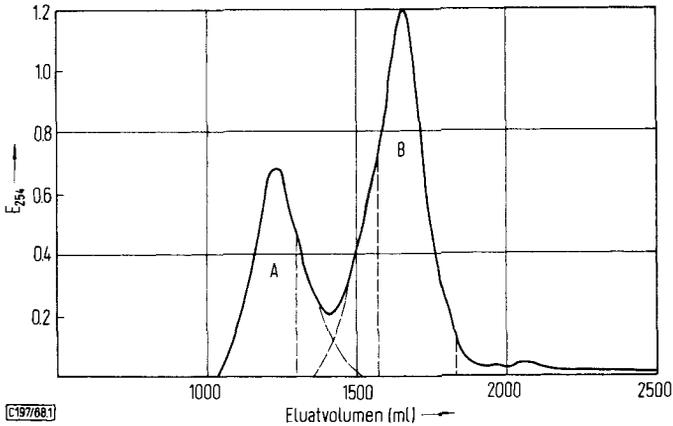
(mit der Partial-Sequenz 1–23 des Glucagons) gelang die Reindarstellung des freien Nonicosapeptids durch Gelfiltration an Sephadex G-50 (Elution mit 0.5proz. Essigsäure).

<sup>1)</sup> XVIII. Mitteil.: *E. Wünsch* und *G. Wendlberger*, Chem. Ber. **101**, 3659 (1968), vorstehend. (Beide Mitteilungen wurden auszugsweise vorgetragen auf dem 9. Europ. Peptid-Symposium, Paris, April 1968.)

<sup>2)</sup> *E. Wünsch*, Z. Naturforsch. **22b**, 1269 (1967).

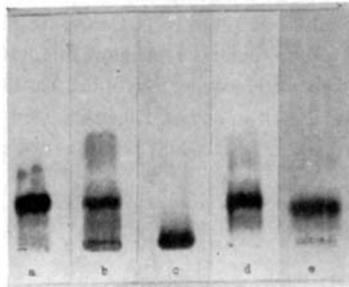
<sup>3)</sup> *W. W. Bromer*, *L. G. Sinn*, *A. Staub* und *O. K. Behrens*, J. Amer. chem. Soc. **78**, 3858 (1956).

Es wurden zwei Hauptfraktionen erhalten (Abbild. 1), von denen die erste (A) zwar die zu erwartende Aminosäurezusammensetzung nach saurer Hydrolyse zeigte, sich in ihren Eigenschaften von Glucagon jedoch weitgehend unterschied (Molekulargewicht, optische Rotationsdispersion, Tyrosin/Tryptophan-Verhältnis und Abbau-



Abbild. 1. Gelfiltration von synthet. „Roh-Glucagon“ an Sephadex G-50. Elutionskurve. Eluans 0.5proz. Essigsäure; Säule  $200 \times 4$  cm

Ergebnis mit Aminopeptidase M wurden unterschiedlich gefunden<sup>4)</sup> und auch keine biologische Aktivität aufwies (maximal 5%). Die zweite Fraktion (B) ergab nach üblicher Gefriertrocknung in ca. 65proz. Ausbeute das gewünschte reine Nonicosa-peptid. Bereits dieses amorphe Produkt erwies sich im chromatographischen Test identisch mit dem natürlichen Hormon (Abbild. 2).

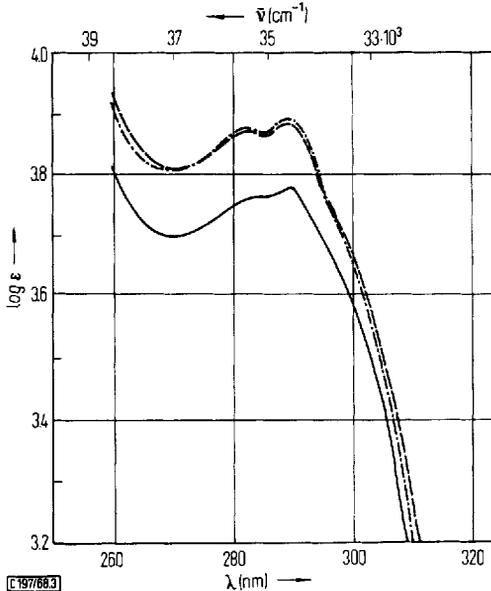


Abbild. 2. Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G im System n-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60:6:24:20); a) natürl. krist. Glucagon, b) synthet. Roh-Glucagon, c) Fraktion A der Trennung an Sephadex G-50, d) Fraktion B, e) krist. synthet. Glucagon

Bei entsprechender Aminosäurezusammensetzung ergab die quantitative Aminosäurebestimmung 85.0%, beim natürlichen Glucagon unter gleichen Bedingungen 85.8%; der Rest von ca. 15% besteht in der Hauptsache aus Wasser, das auch durch

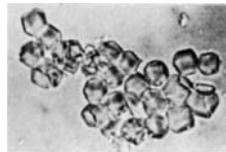
<sup>4)</sup> Über diese Untersuchungen wird zu einem späteren Zeitpunkt noch berichtet.

Trocknen bei 100° i. Hochvak. nicht entfernt werden kann. Das UV-Absorptionsspektrum war mit dem von natürlichem Glucagon praktisch identisch (Abbild. 3) und auch das spektrophotometrisch bestimmte Tyrosin/Tryptophan-Verhältnis<sup>5)</sup> lag in dem für das Hormon ermittelten Bereich.



Abbild. 3. UV-Absorptionsspektren in  $n/10$  NaOH; ——— synthet. Roh-Glucagon; - - - - natürl. Glucagon; - - - - synthet. Glucagon (Sephadex-Fraktion B)

Aus alkalischer Lösung des gefriergetrockneten Nonicosapeptids trat nach Einstellung eines pH-Wertes von ca. 9.0 mit verd. Salzsäure Kristallisation ein. Die abgeschiedenen Kristalle (ca. 60% Ausbeute) zeigten mit natürlichem Glucagon identische Kristallform<sup>6)</sup> (Rhombendodecaeder) (Abbild. 4). Das so gewonnene synthetische Nonicosapeptid verhielt sich in seinen Eigenschaften völlig analog dem Naturstoff, wie insbesondere an Hand von IR-Spektrum, optischer Rotationsdispersion



C197/664

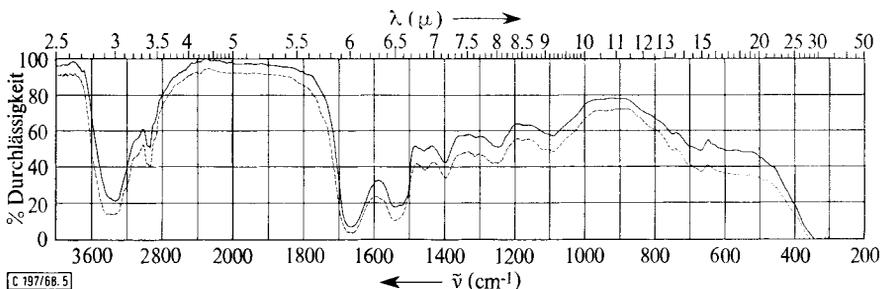
Abbild. 4. Mikrophotographie von kristallisiertem synthet. Glucagon. Neofluar 100/1.3 Oel; Gesamtvergrößerung 1500:1

und Verhalten beim Abbau mit Aminopeptidase M bewiesen werden konnte. Die IR-Spektren von kristallisiertem synthetischem und von natürlichem Hormon stimmen gut überein (Abbild. 5) und zeigen die allgemein für Peptide charakteristischen breiten

<sup>5)</sup> Berechnung nach G. H. Beaven und E. R. Holiday, *Advances Protein Chem.* 7, 319 (1952).

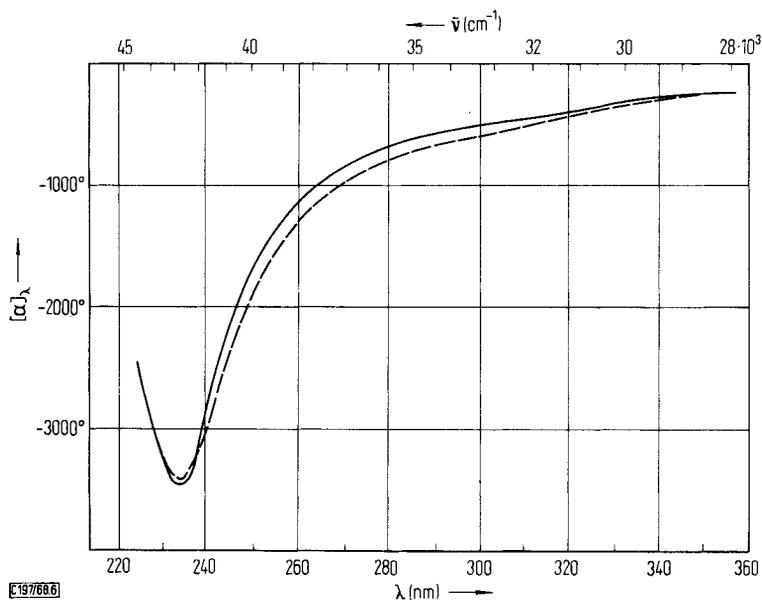
<sup>6)</sup> A. Staub, L. Sinn und O. K. Behrens, *J. biol. Chemistry* 214, 619 (1955).

Hauptbanden<sup>7)</sup> (NH-Valenz 3350/cm; CH-Valenz 2940/cm; C=O-Valenz (Amidbande I) 1665/cm; NH-Deformation (Amidbande II) 1545/cm). Die Lage der Amidbande I bei 1665/cm läßt darauf schließen<sup>8,9)</sup>, daß die synthetischen Kristalle in der



Abbild. 5. IR-Spektren von synthet. krist. Glucagon (—) und natürl. krist. Glucagon (---) (KBr-Mikropräpflinge; 0.1 mg Substanz in 40 mg KBr)

gleichen Konformation vorliegen wie die natürlichen ( $\alpha$ -Helix oder Knäuel, keine  $\beta$ -Konformation). Auch die optische Rotationsdispersionskurve des synthetischen Produktes zeigt zwischen 220 und 360 nm in 0.02proz. Essigsäure (frisch bereitete



Abbild. 6. Optische Rotationsdispersion ( $c = 0.02$  in 0.02proz. Essigsäure; 5 mm Küvette). — natürl. krist. Glucagon; --- synthet. krist. Glucagon

- 7) L. J. Bellamy, „Ultraspektrum und chemische Konstitution“, Verlag D. Steinkopff, Darmstadt 1966.
- 8) T. Miyazawa (Herausgeber M. A. Stahmann) in „Polyamino Acids, Polypeptides and Proteins“, The University of Wisconsin Press, Madison 1962.
- 9) W. B. Grätzer, G. H. Beaven, H. W. E. Rattle und E. M. Bradbury, Europ. J. Biochem. 3, 276 (1968).

Lösungen) nahezu den gleichen Verlauf wie die von natürlichem Hormon (Abbild. 6) und denselben negativen Cotton-Effekt mit einem Tal bei 233 nm. Aus der bei dieser Wellenlänge gemessenen spezifischen Drehung errechnet sich für die mittlere molekulare Drehung pro Aminosäure ein Wert von  $[R']_{233}^{20} = -3800^\circ$  (natürl.) bzw.  $[R']_{233}^{20} = -3720^\circ$  (synthet.), was einem Helix-Anteil von ca. 15% gleichermaßen für natürliches und synthetisches Glucagon entspricht (vgl. l. c.<sup>9)</sup>).

In biologischen Vergleichstesten<sup>10)</sup> zeigte das kristallisierte Syntheseprodukt wie auch bereits das gefriergetrocknete Material in vivo (Anstieg des Blutzuckerspiegels und Plasma-Insulin-Reaktion nach intravenöser Injektion am Menschen und Anstieg des Blutzuckerspiegels nach intravenöser Injektion beim dressierten Hund<sup>11)</sup>) und in vitro (Glucoseabgabe aus Leberschnitten der Ratte,  $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung von  $^{14}\text{C}_6$ -Glucose aus isolierten Fettzellen der Ratte, Abgabe von Glycerin und freien Fettsäuren aus isolierten Fettzellen der Ratte) die volle biologische Aktivität des natürlichen Hormons und ferner die volle Antigeneigenschaft gegenüber dem Antikörper Antiglucagon.

Den *Farbwerken Hoechst AG* sind wir wiederum für umfangreiche finanzielle und materielle Unterstützung dieser Arbeiten zu höchstem Dank verpflichtet, Herrn Priv.-Doz. Dr. K. F. Weinges, II. Medizinische Universitätsklinik, Homburg/Saar, und Herrn Dr. H.-H. Schöne, Farbwerke Hoechst AG, für die Ausführung der biologischen Tests. Ferner danken wir der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für eine Sachbeihilfe.

## Beschreibung der Versuche

Die UV- und IR-Spektren wurden an Geräten der Fa. Beckman (Mod. DB bzw. IR-12) aufgenommen, die Aminosäureanalysen am Automatic Amino Acid Analyzer derselben Firma, Mod. 120 B, ausgeführt und mit einem Differential-Integrator, Mod. Nr. 125, ausgewertet. Die Messungen der optischen Rotationsdispersion und der spezif. Drehwerte erfolgten am registrierenden Spektralphotometer der Fa. Carl Zeiss, Mod. REPM 12, und zur Aufnahme des Kristallphotos diente ein Mikroskop derselben Firma, Mod. Standard RA.

1. *Reinigung von „Roh-Glucagon“ durch Gelfiltration an Sephadex G-50*: Mehrere Stdn. in 0,5proz. Essigsäure gequollenes Sephadex G-50 (250 g) wird wie üblich in eine Säule von 2 m Länge und 4 cm Durchmesser gefüllt; darauf bringt man eine Lösung von 500 mg *Roh-Glucagon* in 100 ccm 1proz. Essigsäure (von geringen unlöslichen Anteilen wird vorher abzentrifugiert), schlämmt mit 2 Portionen von je 50 ccm 0,5proz. Essigsäure ein und eluiert mit demselben Lösungsmittel. In der durchlaufenden Lösung (Durchlaufgeschwindigkeit 100 ccm/Stde.) wird die Konzentration an Peptid durch Messung der Extinktion bei 254 nm (Uvicord) bestimmt und das Eluat in 25-ccm-Fractionen aufgefangen. Die Elutionskurve zeigt die Auftrennung in zwei Hauptkomponenten A und B, die man durch Lyophilisieren der Fractionen 42–52 (275 ccm) und der Fractionen 64–73 (250 ccm) als wasserhaltige Peptide isoliert: 75 mg Komponente A, 290 mg Komponente B.

Durch erneute Trennung der anfallenden Zwischenfractionen werden weitere 30 mg Komponente B rein isoliert.  $[\alpha]_{233}^{20}$ :  $-29.2^\circ$  bzw.  $[\alpha]_{246}^{20}$ :  $-36.2^\circ$  ( $c = 0.5$ ; in 1proz. Essigsäure); Tyr/Trp-Verhältnis, spektrophotometrisch bestimmt: Ber. 2.0; gef. 2.07. Gesamtausbeute 320 mg *Komponente B* (64%).

<sup>10)</sup> K. F. Weinges, G. Birot und E. Wünsch, *Diabetologia*, im Druck. (Auszugsweise vorgetragen von K. F. Weinges auf dem 14. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Heidelberg, März 1968.)

<sup>11)</sup> H.-H. Schöne, unveröffentlichte Privatmitteil.

Aminosäureanalysen (nach 20 Stdn. Hydrolyse mit 6*n* HCl bei 110°)

	a) synthet. Roh-Glucagon	b) Kom- ponente A	c) Kom- ponente B	d) natürl. Glucagon	Ber.
Lys	1.01	0.99	0.98	1.00	1
His	0.98	0.85	0.99	0.90	1
Arg	2.03	1.99	2.08	2.03	2
Asp	3.83	4.03	4.08	4.01	4
Thr	2.95	2.90	3.06	2.98	3
Ser	4.02	4.04	4.01	3.95	4
Glu	3.05	3.03	3.02	2.90	3
Gly	1.10	1.06	1.03	1.00	1
Ala	1.04	1.07	1.01	1.01	1
Val	1.02	1.00	0.96	0.96	1
Met	1.01	1.00	0.98	0.93	1
Leu	2.01	2.00	2.00	2.01	2
Tyr	1.94	1.97	2.05	1.98	2
Phe	2.03	2.02	2.00	1.99	2
Gew.- %	59.5	75.9	85.0	85.8	

*Enzymatischer Abbau mit Aminopeptidase M*<sup>12, 13)</sup>: 1.5 mg *Fraktion B* werden in 1.0 ccm 0.05*m* Trispuffer (pH 7.8) suspendiert und mit 2500 mEU des *Enzyms* (gelöst in 0.05 ccm Wasser) 15 Stdn. bei 37° inkubiert. Dann gibt man 1.2 ccm 0.2*m* Na-Citratpuffer (pH 2.2) zu und trägt von der erhaltenen Lösung je 1 ccm auf die Austauschersäulen des Aminosäureanalysators auf.

	Lys	His	Arg	Asp	Thr	Ser	Gln + Asn	Gly	Ala	Val	Met
Ber.	1	1	2	3	3	4	4	1	1	1	1
Gef.	1.04	0.90	1.96	2.42	3.08	4.08	3.76	1.00	1.06	0.97	0.91
	Leu	Tyr	Phe	Trp							
Ber.	2	2	2	1							
Gef.	1.96	2.07	2.02	0.68							

2. *Kristallisation*: 250 mg *Fraktion B* werden in 25 ccm 0.02proz. NaCl-Lösung suspendiert. Mit 0.1*n* NaOH stellt man einen pH-Wert von ca. 10.5 ein, zentrifugiert von wenig unlöslichem Material ab, gibt dann zur klaren Lösung 0.1*n* HCl bis zur eben beginnenden Trübung (ca. pH 9.0) und läßt 1 Tag bei Raumtemp. sowie mehrere Tage bei 4° stehen. Es scheiden sich Kristalle ab, die durch Zentrifugieren von der Mutterlauge getrennt, mindestens zweimal mit eiskalter 0.02proz. NaCl-Lösung aufgeschlämmt, jeweils erneut abzentrifugiert und anschließend im Exsikkator über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet werden. Ausb. 140 mg (56%).

Aminosäureanalyse (nach 20 Stdn. Hydrolyse mit 6*n* HCl bei 110°):

	Lys	His	Arg	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Met	Leu
Ber.	1	1	2	4	3	4	3	1	1	1	1	2
Gef.	0.99	0.96	1.99	4.00	3.03	4.07	3.09	1.09	1.01	0.98	0.94	1.99
	Tyr	Phe										
Ber.	2	2										
Gef.	1.99	2.04										

<sup>12)</sup> G. Pfeleiderer, P. G. Celliers, M. Stanulovic, E. D. Wachsmuth, H. Determann und G. Braunitzer, *Biochem. Z.* **340**, 552 (1964).

<sup>13)</sup> Aminopeptidase M wurde von der Fa. Röhms & Haas GmbH, Darmstadt, bezogen.

Enzymatischer Abbau mit Aminopeptidase M (15 Stdn. bei 37°):

	Lys	His	Arg	Asp	Thr	Ser	Gln + Asn	
Ber.	1	1	2	3	3	4	4	
Gef. krist. synthet. Glucagon	1.12	0.79	1.94	2.78	2.89	4.09	3.68	
Gef. krist. natürl. Glucagon	1.12	0.86	2.02	2.99	2.77	4.11	3.69	
	Gly	Ala	Val	Met	Leu	Tyr	Phe	Trp
	1	1	1	1	2	2	2	1
	0.91	1.02	1.03	0.98	2.06	1.98	2.02	0.88
	1.00	1.05	1.08	0.92	2.08	1.97	1.95	0.98

*Optische Rotationsdispersion:* 1 mg Peptid wird in 0.1 ccm 1proz. Essigsäure gelöst, die Lösung auf 5 ccm verdünnt und die Kurve sofort registriert (5-mm-Küvette); vgl. Abbild. 6.

[197/68]