Über Peptidsynthesen, XXIX*

4. Mitteilung über Glukagon-Teilsequenzen

SYNTHESE DER GLUKAGON-TEILSEQUENZEN 12—19 UND 1—19

von EBERHARD SCHRÖDER

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering AG, Berlin-West

Eingegangen am 18. Juli 1964

Die Glukagonsequenz 12—19 wurde als N^{ε}-BOC-Lys-Tyr-Leu-Asp(NH_2)-Ser-Arg-Arg-Ala-OH · $2CH_3COOH \cdot 4H_2O$ aus N^{α}-Cbo-N^{ε}-BOC-Lys-Tyr-N_3 und H-Leu-Asp(NH_2)-Ser-(NO_2)Arg-(NO_2)Arg-Ala-$OCH_2C_6H_5 \cdot CF_3COOH$ durch anschließende katalytische Hydrierung des Octapeptids synthetisiert. Umsetzung der Sequenz 12—19 mit der bereits beschriebenen N-terminalen Sequenz 1—11 lieferte das Glukagon-Teilstück 1—19 als BOC-His-(*O*-tBu)Ser-Glu(NH_2)-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp(NH_2)-Tyr-Ser-(N^{ε}-BOC)Lys-Tyr-Leu-Asp(NH_2)-Ser-Arg-Arg-Ala-OH · $2CH_3COOH \cdot 9H_2O$. (Im natürlichen Glukagon befindet sich in den Positionen 9 und 15 Asparagyl anstelle von Asparaginyl.)

In früheren Arbeiten wurde über die Synthese der Glukagon-Teilsequenzen 1—6[1,2], 7—11[1,3] und 1—11[3] in Form verschieden substituierter Derivate berichtet. Nachstehend beschreiben wir den Aufbau der Sequenz 12—19 und deren Kondensation mit der N-terminalen Aminosäurefolge 1—11 zum partiell geschützten Nonadecapeptid 1—19.

Entsprechend dem Schema 1 wurde Carbobenzoxy-nitro-L-arginyl-L-alaninbenzylester[4] mit HBr/Eisessig selektiv decarbobenzoxyliert und der elektrophoretisch einheitliche Dipeptidester nach der Anhydrid-Methode[5] zum Carbobenzoxy-nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-alaninbenzylester kondensiert (78% Ausbeute). Erneute Decarbobenzoxylierung durch Einleiten von HBr-Gas in eine Essigester-Lösung des *geschützten Tripeptids* bei 0° lieferte Nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-alaninbenzylester · 1.5-hydrobromid. Das zur weiteren Kettenverlängerung verwendete tert.-Butyloxycarbonyl-L-leucyl-L-asparaginyl-L-serinhydrazid war durch katalytische Hydrierung von Carbobenzoxy-L-asparaginyl-L-serinmethylester (nergestellt nach der

*) XXVIII. Mitteilung: E. SCHRÖDER, Liebigs Ann. Chem. **681**, 231 (1965), zugleich 3. Mitt. über Glukagon-Teilsequenzen, voranstehend.

1) E. SCHRÖDER und H. GIBIAN, Liebigs Ann. Chem. **656**, 190 (1962).

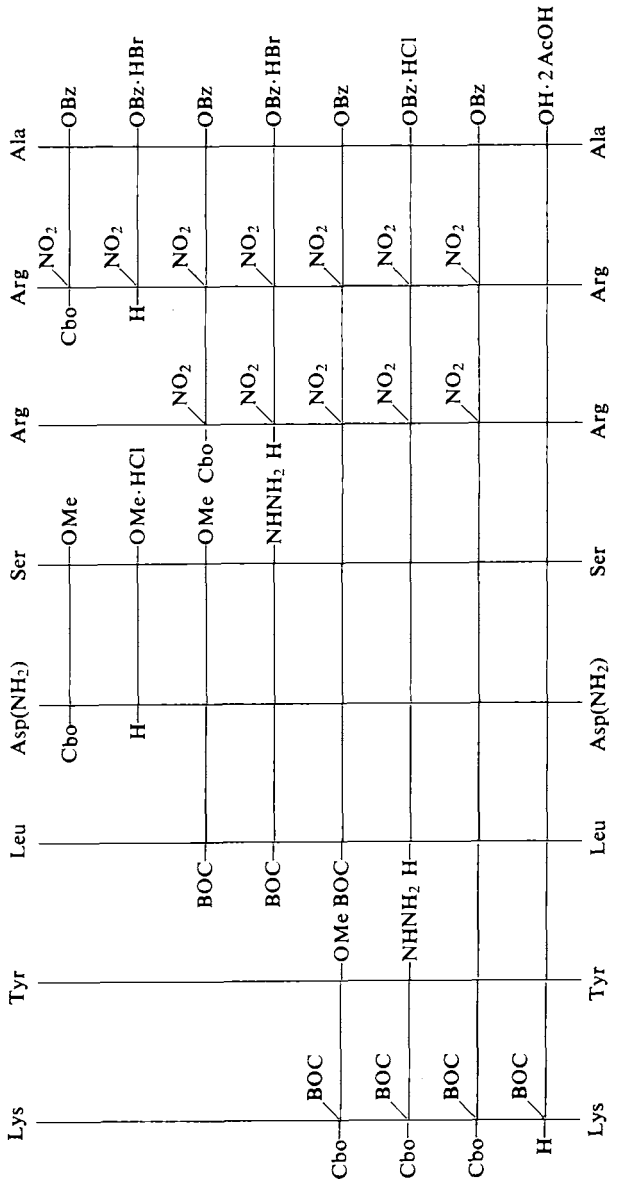
2) E. SCHRÖDER, Liebigs Ann. Chem. **670**, 127 (1963).

3) E. SCHRÖDER, Liebigs Ann. Chem. **681**, 231 (1965), voranstehend.

4) H. GIBIAN und E. SCHRÖDER, Liebigs Ann. Chem. **642**, 145 (1961).

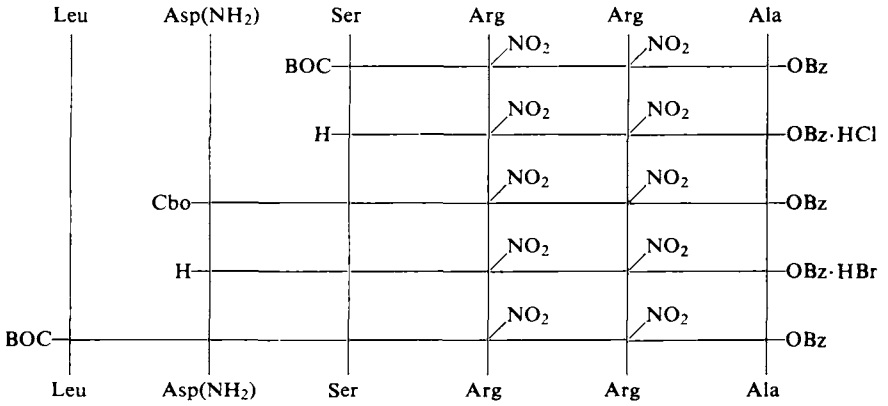
5) R. A. BOISSOANNAS, Helv. chim. Acta **34**, 874 (1951).

Schema 1. Synthese der Glukagonsequenz 12—19



p-Nitrophenylester-Methode[6]), Kupplung des Dipeptidester-hydrochlorids mit tert.-Butyloxycarbonyl-L-leucin nach der Carbodiimid-[7]) oder Anhydrid-Metnode[5]) und Behandlung des tert.-Butyloxycarbonyl-tripeptidesters mit Hydrazinhydrat zugänglich. Die Kupplung beider Tripeptideinheiten lieferte mit 60-proz. Ausbeute den amorphen tert.-Butyloxycarbonyl-L-leucyl-L-asparaginyl-L-seryl-nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-alaninbenzylester. Dieses *Hexapeptidderivat* konnte mit gleicher optischer Drehung auch auf einem zweiten Wege (Schema 2), ausgehend von Nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-alaninbenzylester-hydrobromid, durch schrittweise Ankondensation von tert.-Butyloxycarbonyl-L-serinazid, Carbobenzoxy-L-asparagin-*p*-nitrophenylester[8]) und schließlich tert.-Butyloxycarbonyl-L-leucin (Anhydrid-Methode) gewonnen werden.

Schema 2. Synthese der Glukagonsequenz 14 – 19



Nach Abspaltung der tert.-Butyloxycarbonylgruppe vom Hexapeptidderivat mit 4*n* HCl in Äthanol wurde mit N^{α}-Carbobenzoxy-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-tyrosinazid (aus dem Hydrazid mit tert.-Butylnitrit[9]) umgesetzt und das *substituierte Octapeptid* mit 63-proz. Ausbeute isoliert. Durch katalytische Hydrierung wurden die N-terminale Carbobenzoxygruppe, der C-terminale Benzylester und die beiden Nitrogruppen entfernt. Das nicht einheitliche Rohprodukt wurde durch präparative Elektrophorese[10,11]) (Pheroplan®) in Pyridiniumacetat-Puffer gereinigt und N^{ε}-BOC-Lys-Tyr-Leu-Asp(NH_2)-Ser-Arg-Arg-Ala-OH · 2 CH_3COOH · 4 H_2O als gefriergetrocknetes, elektrophoretisch einheitliches Produkt isoliert.

[6]) M. BODANSZKY, Acta chim. Acad. Sci. hung. **10**, 335 (1956).
[7]) J. C. SHEEHAN und G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1067 (1955).
[8]) M. BODANSZKY und V. DU VIGNEAUD, J. Amer. chem. Soc. **81**, 5688 (1959).
[9]) J. HONZL und J. RUDINGER, Collect. czechoslov. chem. Commun. **26**, 2333 (1961) [C. A. **55**, 27108 (1961)].
[10]) J. BARROLLIER, E. WATZKE und H. GIBIAN, Z. Naturforsch. **13b**, 754 (1958).
[11]) E. SCHRÖDER und S. MATTHES, J. Chromatogr. [Amsterdam], im Druck.

Mit *Leucinaminopeptidase* konnte das Octapeptid quantitativ in die einzelnen Aminosäuren aufgespalten werden. Nach Behandlung mit Chymotrypsin und Trypsin war ebenfalls kein Octapeptid mehr nachweisbar.

Eine Kupplung der N-terminalen Teilsequenz 1–11, BOC-His-(*O*-tBu)Ser-Glu(NH_2)-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp(NH_2)-Tyr-Ser-$NHNH_2$[3] (Azidbildung mit tert.-Butylnitrit), mit dem obigen Octapeptid lieferte mit ca. 50-proz. Ausbeute das N-terminale *Nonadecapeptid:* BOC-His-(*O*-tBu)Ser-Glu(NH_2)-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp(NH_2)-Tyr-Ser-(N^{ε}-BOC)Lys-Tyr-Leu-Asp(NH_2)-Ser-Arg-Arg-Ala-OH · $9H_2O$. Die Verbindung konnte durch Behandlung mit warmem Athanol und Ammoniumacetatpuffer von anhaftender Amino- und Carboxylkomponente weitgehend befreit werden. Da im Elektropherogramm nur zwei Nebenbanden schwach sichtbar sind, ist das Nonadecapeptid für eine weitere Kupplung geeignet.

Für die Durchführung der präparativen Arbeiten danke ich Frl. D. THIELICKE, für die enzymatischen Abbauversuche Herrn G. KLOSS.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Methodische Einzelheiten über *Schmelzpunkte*, *Papier-* und *Dünnschichtchromatogramme* und *Elektropherogramme* vgl. XXVIII. Mitteilung. Die Anfärbungen erfolgten mit Ninhydrin-Cd[12], nach der Chlor-Methode[13], nach der SAKAGUCHI-[14] und PAULI-Methode[15].

Glukagon 12–19

Nitro-L-arginyl-L-alaninbenzylester-hydrobromid. — 1.03 g *Carbobenzoxy-nitro-L-arginyl-L-alaninbenzylester*[4] werden 1/2 Stde. mit 3 ccm HBr-haltigem Eisessig (18-proz.) und 0.1 ccm Diäthylphosphit stehengelassen. Nach dem Fällen mit absol. Äther und 2maligem Umfällen aus Äthanol/Äther erhält man 820 mg (89%) schwach hygroskopisches Pulver. $[\alpha]_D^{23} = -13.0°$ ($c = 1$, Wasser).

$C_{16}H_{24}N_6O_5 \cdot HBr$ (461.3)	Ber.	C 41.65	H 5.46	Br 17.34	O 17.33
	Gef.	41.01	5.47	17.51	17.30

Carbobenzoxy-nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-alaninbenzylester. — Zu einer Lösung von 49.5 g (140 mMol) *Carbobenzoxy-nitro-L-arginin*[16] in 50 ccm Dimethylformamid, 150 ccm Tetrahydrofuran und 19.3 ccm Triäthylamin werden bei −10° 13.3 ccm *Chlorkohlensäureäthylester* getropft. Nach 10 Min. Stehenlassen bei −5° wird *Nitro-L-arginyl-L-alaninbenzylester* (aus 140 mMol Hydrobromid mit Triäthylamin) in 100 ccm Dimethylformamid zugegeben, langsam auf Raumtemperatur erwärmt, nach Stehenlassen über Nacht vom Tri-

[12] J. BARROLLIER, Naturwissenschaften **42**, 416 (1955).
[13] H. ZAHN und E. REXROTH, Z. analyt. Chem. **148**, 181 (1955/56).
[14] S. SAKAGUCHI, J. Biochemistry [Tokyo] **37**, 231 (1950); vgl. H. FRAENKEL-CONRAT, J. I. HARRIS und A. L. LEVY, Methods biochem. Analysis **2**, 377 (1955).
[15] R. BLOCK, E. M. DURRUM und G. ZWEIG, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, Academic Press, New York 1955, S. 95.
[16] K. HOFMANN, W. D. PECKHAM und A. RHEINER, J. Amer. chem. Soc. **78**, 238 (1956).

äthylamin-hydrochlorid abgetrennt und i. Vak. eingeengt. Der Rückstand wird in einem n-Butanol/Essigester-Gemisch aufgelöst und sorgfältig mit 1 *n* HCl, gesätt. $NaHCO_3$-Lösung und Wasser ausgeschüttelt. Nach Einengen und Umfällen aus Äthanol/Äther werden 78 g (78%) amorphes Produkt erhalten. $[\alpha]_D^{22} = -17.2°$ ($c = 1$, Eisessig).

$C_{30}H_{41}N_{11}O_{10}$ (715.7) Ber. C 50.34 H 5.77 N 21.53 Gef. C 50.33 H 6.56 N 21.83

Nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-alaninbenzylester-hydrobromid. — In eine Suspension von 20 g *Carbobenzoxy-nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-alaninbenzylester* in 200 ccm Essigester wird bei 0° 25 Min. *HBr-Gas* eingeleitet. Dabei löst sich die Substanz vollständig. Man fällt mit kaltem absol. Äther und erhält nach Auswaschen mit Äther und Trocknen über KOH 19.6 g (100%) Ester, der 1.5 Mol HBr enthält.

$C_{22}H_{35}N_{11}O_8 \cdot 1.5\,HBr$ (703.0) Ber. C 37.58 H 5.23 Br 17.05 O 18.21
Gef. 37.47 5.74 16.84 18.70

Carbobenzoxy-L-asparaginyl-L-serinmethylester. — Eine Lösung von 3.87 g (10 mMol) *Carbobenzoxy-L-asparagin-p-nitrophenylester*[8] in 50 ccm Essigester + 4 ccm Dimethylformamid wird mit *L-Serinmethylester* (aus 11 mMol Hydrochlorid[17] mit Triäthylamin) in 4 ccm Dimethylformamid vereinigt. Das Gemisch wird 50 Stdn. bei 35° und kurze Zeit bei Raumtemperatur und in der Kälte stehengelassen. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Essigester und Äther/Petroläther gewaschen und ergibt nach Umkristallisation aus Äthanol 2.6 g (71%). Schmp. 195–196°. $[\alpha]_D^{22} = +18.2°$ ($c = 1$, Eisessig).

$C_{16}H_{21}N_3O_7$ (367.4) Ber. C 52.29 H 5.77 N 11.44 O 30.48
Gef. 52.20 5.78 11.88 30.61

L-Asparaginyl-L-serinmethylester-hydrochlorid. — 18.37 g *Carbobenzoxy-L-asparaginyl-L-serinmethylester* in 450 ccm Methanol und 50 ccm *1 n HCl* werden mit *Pd-Mohr* hydriert. Der nach Einengen i. Vak. und Trocknen verbleibende Rückstand wird aus Äthanol/Äther umgefällt. Ausbeute 13.3 g (99%). $[\alpha]_D^{22} = +20.5°$ ($c = 1$, Eisessig).

$C_8H_{15}N_3O_5 \cdot HCl$ (269.7) Ber. C 35.63 H 5.97 Cl 13.15 Gef. C 35.24 H 6.42 Cl 13.25

tert.-Butyloxycarbonyl-L-leucyl-L-asparaginyl-L-serinmethylester. — a) *Carbodiimid-Methode:* 7.49 g (30 mMol) *tert.-Butyloxycarbonyl-L-leucin · H_2O*[18] in 30 ccm Tetrahydrofuran werden mit *L-Asparaginyl-L-serinmethylester* (aus 33 mMol Hydrochlorid mit Triäthylamin) in 20 ccm Dimethylformamid und nach Abkühlen auf −20° mit 7.5 g (36 mMol) *N.N'-Dicyclohexyl-carbodiimid* in 20 ccm Tetrahydrofuran vereinigt. Nach ca. 3 Stdn. bei 0° und 24 Stdn. bei Raumtemperatur wird vom *N.N'*-Dicyclohexyl-harnstoff abfiltriert, eingeengt, mehrmals mit Petroläther digeriert, in Essigester aufgelöst und mit wenig Citronensäure-Lösung, gesätt. $NaHCO_3$-Lösung und wenig Wasser ausgeschüttelt. Aus Essigester/Petroläther 7.4 g (55%) vom Schmp. 128–130°. $[\alpha]_D^{22} = -14.8°$ ($c = 1$, Dimethylformamid).

b) *Anhydrid-Methode:* 59.6 g (0.24 Mol) *tert.-Butyloxycarbonyl-L-leucin · H_2O*[18] in 200 ccm Tetrahydrofuran + 33.2 ccm Triäthylamin werden bei −10° mit 22.8 ccm *Chlorkohlensäure-äthylester* und nach 10 Min. mit *L-Asparaginyl-L-serinmethylester* (aus 0.28 Mol Hydro-

[17] ST. GUTTMANN und R. A. BOISSONNAS, Helv. chim. Acta **41**, 1852 (1958).
[18] G. W. ANDERSON und A. C. MCGREGOR, J. Amer. chem. Soc. **79**, 6180 (1957).

chlorid mit Triäthylamin) in 200 ccm Dimethylformamid versetzt. Das Gemisch wird langsam auf Raumtemperatur erwärmt und nach Stehenlassen über Nacht wie üblich aufgearbeitet. Ausbeute aus Essigester 75.5 g (71%) amorphes Produkt, Schmelzpunkt unscharf. $[\alpha]_D^{22} = -14.2°$ ($c = 1$, Dimethylformamid).

$C_{19}H_{34}N_4O_8$ (446.5) Ber. C 51.10 H 7.67 N 12.55 Gef. C 51.31 H 8.15 N 12.42

tert.-Butyloxycarbonyl-L-leucyl-L-asparaginyl-L-serinhydrazid. — 4.91 g *tert.-Butyloxycarbonyl-L-leucyl-L-asparaginyl-L-serinmethylester* in 20 ccm Äthanol werden mit 2.2 ccm $N_2H_4 \cdot H_2O$ 24 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Das ausgefallene Produkt wird abgesaugt, mit Äthanol und Äther nachgewaschen, über H_2SO_4 getrocknet und aus Äthanol/Dimethylformamid umkristallisiert. Ausbeute 4.0 g (81%). Schmp. 194—196°, nach erneuter Umkristallisation 195—196.5°. $[\alpha]_D^{22} = -26.0°$ ($c = 0.5$, Dimethylformamid).

$C_{18}H_{34}N_6O_7$ (446.5) Ber. C 48.41 H 7.68 N 18.82 Gef. C 47.77 H 8.26 N 18.46

tert.-Butyloxycarbonyl-L-seryl-nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-alaninbenzylester. — Einer Suspension von 1.32 g *tert.-Butyloxycarbonyl-L-serinhydrazid*[19] in 3 ccm Dimethylformamid + 5.8 ccm HCl-haltigem Tetrahydrofuran (2.2*n*) werden bei −20° 0.73 ccm *tert.-Butylnitrit*[9] zugesetzt. Nach 5 Min. Reaktion (vollständige Lösung) wird mit ca. 15 ccm Essigester verdünnt, mit Triäthylamin neutralisiert und nach Absaugen des Triäthylamin-hydrochlorids mit *Nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-alaninbenzylester* (aus dem Hydrobromid mit Triäthylamin) in Dimethylformamid vereinigt. Nach je 24stdg. Stehenlassen in der Kälte und bei Raumtemperatur wird i. Vak. eingeengt, der Rückstand in n-Butanol aufgelöst, wie üblich gereinigt und nach Abdestillieren aus Äthanol/Äther umgefällt. Ausbeute 2.3 g (50%). $[\alpha]_D^{22} = -19.0°$ ($c = 1$, Dimethylformamid).

$C_{30}H_{48}N_{12}O_{12}$ (768.8) Ber. C 46.86 H 6.29 N 21.87 Gef. C 46.85 H 6.58 N 22.20

L-Seryl-nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-alaninbenzylester-hydrochlorid. — 3.08 g *tert.-Butyloxycarbonyl-L-seryl-nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-alaninbenzylester* werden 80 Min. mit 20 ccm *4n HCl* in Äthanol geschüttelt. Man fällt mit Äther und erhält nach Umfällen aus Äthanol/Äther 2.6 g (88%). Die Substanz enthält 2 Mol HCl. $[\alpha]_D^{22} = -12.9°$ ($c = 1$, Dimethylformamid).

$C_{25}H_{40}N_{12}O_{10} \cdot 2HCl$ (741.6) Ber. Cl 9.56 O 21.56 Gef. Cl 10.26 O 21.32

Carbobenzoxy-L-asparaginyl-L-seryl-nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-alaninbenzylester. — 770 mg (2 mMol) *Carbobenzoxy-L-asparaginnitrophenylester*[8] in 10 ccm Essigester + 2 ccm Dimethylformamid werden mit *L-Seryl-nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-alaninbenzylester* (aus 2.2 Mol Hydrochlorid mit Triäthylamin) in 8 ccm Dimethylformamid 3 Tage auf 35° erwärmt. Die Lösung wird eingeengt. Da der ölige Rückstand in Essigester sehr schwer, in Wasser aber zum Teil löslich ist, wurde der üblichen Reinigung eine Behandlung mit Ionenaustauschern vorgezogen. Dazu wurde die Substanz in 60 ccm Dioxan und 20 ccm Wasser gelöst und 2 Stdn. mit Dowex 50 ($H^{\oplus}$-Form) gerührt. Nach Umfällen aus Äthanol/Äther wurden 1.5 g (82%) amorphes Produkt erhalten. $[\alpha]_D^{22} = -20.4°$ ($c = 1$, Dimethylformamid).

$C_{37}H_{52}N_{14}O_{14}$ (916.9) Ber. N 21.39 O 24.43 Gef. N 20.87 O 24.55

---

[19] B. ISELIN und R. SCHWYZER, Helv. chim. Acta **44**, 169 (1961).

L-Asparaginyl-L-seryl-nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-alaninbenzylester-hydrobromid. — In eine Lösung von 1.1 g des voranstehenden *Benzylesters* in 20 ccm Trifluoressigsäure wird bei 0° 30 Min. *HBr-Gas* eingeleitet. Die Trifluoressigsäure wird abdestilliert und durch Zusatz von Äther das Produkt in fester Form ausgefällt. Ausbeute 1.2 g (100%). $[\alpha]_D^{22} = -12.0°$ ($c = 0.5$, Dimethylformamid).

$C_{29}H_{46}N_{14}O_{12} \cdot 2.75\ HBr \cdot H_2O$ (1023.3) Ber. Br 21.48 O 20.33 Gef. Br 21.46 O 20.72

tert.-Butyloxycarbonyl-L-leucyl-L-asparaginyl-L-seryl-nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-alaninbenzylester. — a) *Aus 3 + 3:* 1.34 g (3 mMol) *tert.-Butyloxycarbonyl-L-leucyl-L-asparaginyl-L-serin-hydrazid* in 18 ccm Eisessig, 12 ccm 2*n* HCl und 10 ccm Wasser werden bei 0–5° mit 210 mg $NaNO_2$ in 3 ccm Wasser versetzt. Das entstandene Azid wird nach Zugabe von NaCl 2mal mit Essigester extrahiert und nach Neutralwaschen mit $NaHCO_3$-Lösung und Trocknen über Na_2SO_4 mit einer Lösung von *Nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-alaninbenzylester* (aus 3.3 mMol Hydrobromid mit Triäthylamin) in 30 ccm Dimethylformamid versetzt. Nach je 24stdg. Stehenlassen in der Kälte und bei Raumtemperatur wird eingeengt, der Rückstand in Butanol/Essigester aufgelöst und wie üblich ausgeschüttelt. Aus Äthanol/Äther erhält man 1.8 g (60%) amorphes Pulver. $[\alpha]_D^{22} = -26.2°$ ($c = 0.5$, Dimethylformamid).

$C_{40}H_{65}N_{15}O_{15}$ (996.0) Ber. C 48.23 H 6.58 N 21.10 Gef. C 48.53 H 6.78 N 20.95

b) *Aus 1 + 5:* 374 mg (1.5 mMol) *tert.-Butyloxycarbonyl-L-leucin* · H_2O [18] in 5 ccm Tetrahydrofuran + 0.21 ccm Triäthylamin werden bei −15° mit 0.14 ccm *Chlorkohlensäureäthylester* und nach 10 Min. mit *L-Asparaginyl-L-seryl-nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-alaninbenzylester* (aus 0.75 mMol Hydrobromid mit Triäthylamin) in 3 ccm Dimethylformamid vereinigt. Nach 20stdg. Stehenlassen bei Raumtemperatur wird vom Triäthylamin-hydrochlorid abgesaugt, i. Vak. abdestilliert, in Essigester/Butanol gelöst und wie üblich gereinigt. Aus Äthanol/Äther umgefällt, erhält man 330 mg (46%). $[\alpha]_D^{22} = -26.8°$ ($c = 0.5$, Dimethylformamid).

L-Leucyl-L-asparaginyl-L-seryl-nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-alaninbenzylester-hydrochlorid. — 4.96 g des voranstehenden *Esters* werden 90 Min. mit 25 ccm *4n HCl* in Äthanol geschüttelt. Das auf Zusatz von Äther ausgefällte Produkt ergibt nach mehrmaligem Umfällen aus Äthanol/Äther 4.5 g (95%) Substanz, die 1.5 Mol HCl enthält. $[\alpha]_D^{22} = -13.3°$ ($c = 1$, Dimethylformamid).

$C_{35}H_{57}N_{15}O_{13} \cdot 1.5\,HCl$ (950.6) Ber. C 44.22 H 6.20 Cl 5.59 Gef. C 44.22 H 6.34 Cl 5.08

L-Leucyl-L-asparaginyl-L-seryl-nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-alaninbenzylester-trifluoracetat. — 236 mg des voranstehenden *tert.-Butyloxycarbonyl-hexapeptidbenzylesters* werden 90 Min. mit 2.1 ccm *Trifluoressigsäure* behandelt. Nach Ausfällen mit Äther erhält man 0.23 g (91%). $[\alpha]_D^{22} = -12.0°$ ($c = 0.5$, Dimethylformamid).

$C_{35}H_{57}N_{15}O_{13} \cdot CF_3COOH$ (1010.0) Ber. F 5.64 Gef. F 5.89

N^{α}-Carbobenzoxy-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-tyrosinmethylester. — 38 g (100 mMol) *N^{α}-Carbobenzoxy-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysin* [20] in 150 ccm Tetrahydrofuran

[20] R. SCHWYZER und W. RITTEL, Helv. chim. Acta **44**, 159 (1961).

+ 13.8 ccm Triäthylamin werden bei −10° mit 9.5 ccm *Chlorkohlensäureäthylester* und nach 10 Min. mit *L-Tyrosinmethylester* (aus 110 mMol Hydrochlorid [21]) mit Triäthylamin) in 30 ccm Dimethylformamid und 50 ccm Tetrahydrofuran vereinigt. Nach 20stdg. Stehenlassen bei Raumtemperatur wird vom Triäthylamin-hydrochlorid abgesaugt, eingeengt, in Essigester aufgenommen und wie üblich gereinigt. Ausbeute 46.9 g (84%) Öl.

N -Carbobenzoxy-N$^{\varepsilon}$-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-tyrosinhydrazid. — 56 g *N$^{\alpha}$-Carbobenzoxy-N$^{\varepsilon}$-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-tyrosinmethylester* in 250 ccm Äthanol werden mit 20 ccm $N_2H_4 \cdot H_2O$ 1 Stde. auf 80° erhitzt und sodann 24 Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit Äthanol und Äther gewaschen. Ausbeute 45.6 g (81.5%). Schmp. 206–207°, nach Umkristallisation aus Dimethylformamid/Wasser 207–208°. $[\alpha]_D^{22} = -12.9°$ (c = 1, Dimethylformamid).

$C_{28}H_{39}N_5O_7$ (557.6) Ber. C 60.31 H 7.05 N 12.56 Gef. C 59.77 H 7.05 N 12.77

N$^{\alpha}$-Carbobenzoxy-N$^{\varepsilon}$-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginyl-L-seryl-nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-alaninbenzylester. — Zu einer Lösung von 2.36 g (4.2 mMol) des voranstehenden *Hydrazids* in 4 ccm Dimethylformamid + 4 ccm HCl-haltigem Tetrahydrofuran (2.2n) werden bei −15° 0.51 ccm *tert.-Butylnitrit*[9]) gegeben. Nach 10 Min. wird mit 30 ccm kaltem Essigester verdünnt, mit gesätt. $NaHCO_3$-Lösung neutral gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und mit *L-Leucyl-L-asparaginyl-L-seryl-nitro-L-arginyl-nitro-L-arginyl-L-alaninbenzylester* (aus 4.2 mMol Hydrochlorid mit Triäthylamin) in 15 ccm Dimethylformamid vereinigt und mit weiteren 15 ccm Dimethylformamid verdünnt. Das Reaktionsgemisch wird 24 Stdn. bei 5° und 24 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Gallertig ausgefallenes Produkt wird abgesaugt und mit Essigester gewaschen: 1.1 g (18%), Schmp. 207–208°, $[\alpha]_D^{22} = -27.8°$ (c = 0.5, Dimethylformamid). Das Filtrat wird eingeengt, der Rückstand in n-Butanol aufgelöst, mit Citronensäure-Lösung und gesätt. $NaHCO_3$-Lösung ausgeschüttelt und eingeengt. Man erhält nach 2maligem Umkristallisieren aus Dimethylformamid/Wasser 2.7 g (45%). Schmp. 198–206°. $[\alpha]_D^{22} = -25.2°$ (c = 0.5, Dimethylformamid).

$C_{63}H_{92}N_{18}O_{20} \cdot 2H_2O$ (1457.5) Ber. C 51.91 H 6.63 N 17.30 H_2O 2.47
Gef. 52.19 6.59 17.86 2.36

N$^{\varepsilon}$-tert.-Butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginyl-L-seryl-L-arginyl-L-arginyl-L-alanin · 2 $CH_3COOH \cdot 4 H_2O$. — 1.4 g des voranstehenden *Benzylesters* werden in 30 ccm 90-proz. Essigsäure mit *Pd-Mohr* bei 35° hydriert. Nach Einengen i. Vak. und Trocknen über KOH wird das Produkt mittels präparativer Elektrophorese (Pheroplan)[10,11]) in Pyridiniumacetat-Puffer bei pH 5 gereinigt. Hierbei werden 475 mg (37%) elektrophoretisch einheitliches Produkt erhalten. $[\alpha]_D^{22} = -31.6°$ (c = 0.5, Wasser).

$C_{48}H_{82}N_{16}O_{14} \cdot 2CH_3COOH \cdot 4H_2O$ (1299.4)
Ber. C 48.06 H 7.60 N 17.25 H_2O 5.53 $COCH_3$ 6.61
Gef. 48.32 7.69 17.23 5.70 6.25

Aminosäureanalyse (48 Stdn., Hydrolyse 105°): $Lys_{1.11}$; $Tyr_{0.74}$; $Leu_{1.00}$; $Asp_{1.03}$; $Ser_{0.83}$; $Arg_{1.84}$; $Ala_{1.01}$.

[21]) R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD und J.-P. WALLER, Helv. chim. Acta **38**, 1491 (1955).

Glukagon 1—19

tert.-Butyloxycarbonyl-L-histidyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutaminyl-glycyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-L-seryl-L-asparaginyl-L-tyrosyl-L-seryl-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginyl-L-seryl-L-arginyl-L-arginyl-L-alanin·2CH_3COOH·9H_2O. — 280 mg (0.2 mMol) *tert.-Butyloxycarbonyl-L-histidyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutaminyl-glycyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-L-seryl-L-asparaginyl-L-tyrosyl-L-serinhydrazid*[3], in 2 ccm Dimethylformamid + 0.5 ccm Dimethylsulfoxyd gelöst, werden bei −15° mit 0.3 ccm HCl-haltigem Tetrahydrofuran (2.2*n*) und 0.025 ccm *tert.-Butylnitrit* versetzt und ca. 10 Min. in der Kälte gerührt. Nach Verdünnen mit 4 ccm Dimethylformamid wird mit Triäthylamin neutralisiert, vom Triäthylamin-hydrochlorid abgesaugt und mit einer Lösung von 260 mg (0.2 mMol) *N^{ε}-tert.-Butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginyl-L-seryl-L-arginyl-L-arginyl-L-alanin·2CH_3COOH·4H_2O* in 2.5 ccm Dimethylformamid vereinigt. Nach 24 Stdn. bei 0° und 24 Stdn. bei Raumtemperatur wird das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand zur Entfernung der Aminokomponente 2—3 Stdn. mit heißem Äthanol (ca. 50°) gerührt. Das nach Absaugen und Trocknen erhaltene Produkt wird kurze Zeit mit 3 ccm 7.5 *m* Ammoniumacetat-Puffer erwärmt, abgesaugt, auf der Nutsche schnell mit wenig kaltem 0.1 *m* Ammoniumacetat gewaschen, in Wasser unter Zusatz von einigen Tropfen Essigsäure aufgelöst und gefriergetrocknet. Ausbeute 262 mg (47.6%). $[\alpha]_D^{22} = -38.0°$ ($c = 0.5$, 2*n* Essigsäure).

$C_{109}H_{169}N_{31}O_{35}\cdot 2CH_3COOH\cdot 9H_2O$ (2756.1)

Ber.	C 49.25	H 7.13	N 15.75	$COCH_3$ 3.12	H_2O 5.89
Gef.	50.18	7.23	15.37	2.96	5.73