

Erich Wünsch, Ernst Jaeger, Mechtild Deffner, Regina Scharf und Peter Lehnert *)

Zur Synthese des Sekretins, VI **) 1)

Reindarstellung des synthetischen Sekretins

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

(Eingegangen am 3. März 1972)

Die Reindarstellung des Heptacosapeptid-amids

H-His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Arg-Leu-Arg-Asp-Ser-Ala-Arg-Leu-Gln-
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂
21 22 23 24 25 26 27

aus dem durch Trifluoressigsäure-Demaskierung des allseits geschützten Heptacosapeptid-Derivats erhaltenen Rohsekretin gelingt zweckmäßig durch Ionenaustausch-Chromatographie an SP-Sephadex C-25. Das durch Gefriertrocknung erhaltene amorphe Produkt zeigt volle biologische Aktivität des Naturstoffs; bei einwandfreien Aminosäure-Analysenwerten verhalten sich synthetisches Heptacosapeptid-amid und natürliches Sekretin in den chromatographischen und elektrophoretischen Tests sowie unter den Bedingungen des Trypsin-Abbaus identisch.

The Synthesis of Secretin, VI¹⁾

Purification of Synthetic Secretin

The preparation of the pure heptacosapeptideamide

H-His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Arg-Leu-Arg-Asp-Ser-Ala-Arg-Leu-Gln-
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂
21 22 23 24 25 26 27

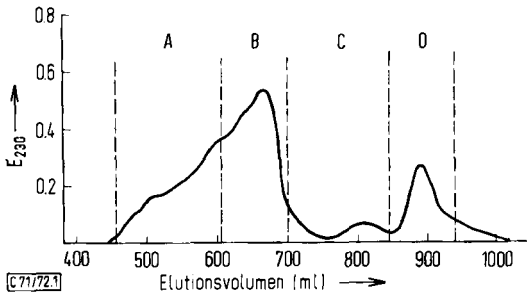
from crude secretin, which was obtained by demasking of the overall protected heptacosapeptide derivative by means of trifluoroacetic acid, is possible by ionexchange chromatography on SP-Sephadex C-25. The amorphous product being isolated by lyophilisation displays the full biological activity of the natural product. In addition to unobjectionable values of amino acid analysis, the synthetic heptacosapeptideamide behaves indential to natural secretin in chromatographic and electrophoretic tests as well as under the conditions of a trypsin degradation.

*) II. Medizinische Klinik der Universität München, Abteilung für Gastroenterologie, Leiter: Prof. Dr. M. M. Forell.

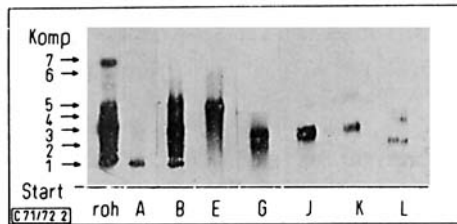
**) Auszugsweise vorgetragen: E. Wünsch, „Roche-Symposium“, Cambridge, Dezember 1971.

1) V. Mitteil.: E. Wünsch und G. Wendlberger, Chem. Ber. **105**, 2508 (1972), vorstehend.

In der vorausgehenden Mitteilung¹⁾ haben wir die Darstellung von Rohsekretin 1-27b durch Trifluoressigsäure-Solvolyse von AdOC-His(AdOC)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Leu-Arg-(HBr)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂ [1-27a] beschrieben. Gestützt auf unsere Erfahrungen bei der Reindarstellung des synthetischen Glucagons²⁾ haben wir an Hand eines „Vorsynthese-Rohsekretins“ die Sekretinreinigung zunächst durch Gelfiltration an Sephadex G-50 versucht³⁾. Sowohl am Verlauf der Elutionskurve (Abbild. 1) als auch am Ergebnis der dünnenschicht-chromatographischen Analyse (Abbild. 2) war jedoch ersichtlich, daß hiermit keine vollständige Abtrennung aller auftretenden Nebenprodukte zu erreichen war. Die Hauptfraktion B enthielt noch vier verschiedene Verunreinigungen (Komponenten 1, 2, 4 und 5), die weder durch wiederholte Gel-Chromatographie am gleichen Geltyp noch durch Verwendung von Sephadex G-25 oder G-100 abgetrennt werden konnten.



Abbild. 1. Gelfiltration von synthetischem „Roh-Sekretin I“ an Sephadex G-50.
Elutionskurve



Abbild. 2. Dünnenschicht-Chromatographie der „Sekretin I-Fractionen“ an Kieselgel G;
n-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60 : 6 : 24 : 20)

Bei Anwendung der Methode der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese (Abbild. 3) war eine weitere Auftrennung der Sephadex-Fraktion B in die Fraktionen E, F und G zu erreichen. Im Gegensatz zu den Verunreinigungen 4 und 5, die in den

²⁾ E. Wünsch, E. Jaeger und R. Scharf, Chem. Ber. 101, 3664 (1968).

³⁾ E. Jaeger, M. Deffner, K.-H. Deimer, R. Scharf und E. Wünsch, Peptides 1971, Proc. XIth Europ. Peptide Symposium, Vienna 1971, North-Holland Publ. Co., im Druck.

Fractionen E und F angereichert waren, wanderte das gesuchte Heptacosapeptidamid [1-27] (in Abbild. 2 als Komponente 3 bezeichnet) im elektrischen Feld zusammen mit der unbekanntenen Komponente 2 wesentlich weiter zur Kathode (Fraktion G).

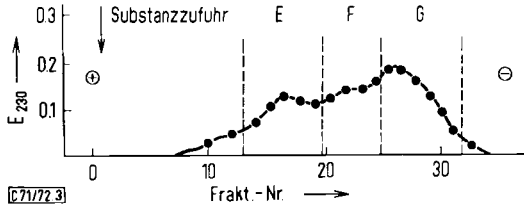


Abbildung 3. Trägerfreie kontinuierliche Elektrophorese von synthet. Sekretin I-Sephadex-Fraktion B

Erst durch Anwendung einer dritten Reinigungsoperation, nämlich der Ionenaustausch-Chromatographie am SP-Sephadex-Ionenaustauscher C-25 — bei schrittweisem pH-Gradienten und gleichzeitiger Änderung der Molarität der Lösung — konnte die Komponente 2 der Elphor-Fraktion G abgetrennt werden. Die Elutionskurve zeigte deutlich eine Auftrennung in die vier Fraktionen H, J, K und L (Abbildung 4).

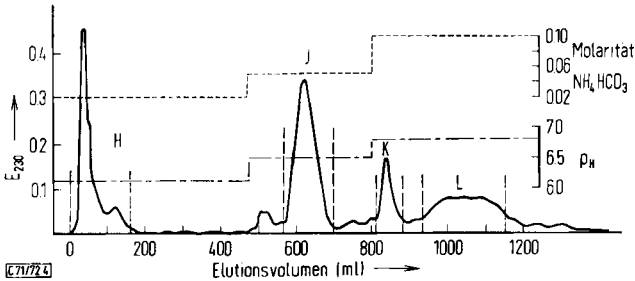


Abbildung 4. Ionenaustausch-Chromatographie von synthet. Sekretin I-Elphor-Fraktion G an SP-Sephadex C-25. Elutionsdiagramm

An den Dünnschicht-Chromatogrammen dieser Fraktionen (Abbildung. 2) war ersichtlich, daß die Fraktion J reines Sekretin, Fraktion L dagegen die Komponente 2 enthält, während in Fraktion K neben angereicherten Resten des vorher bei der Elektrophorese nicht vollständig abgetrennten Nebenproduktes 5 eine weitere Substanz vorlag, die sich dünnschicht-chromatographisch wie Sekretin verhielt. Der Vorlauf H (ca. 2 Gew.-Proz.) bestand aus einer chromatographisch verschmierten, nicht definierten Substanzmischung (vermutlich Produkte unvollständiger Schutzgruppenabspaltung).

Neben der Dünnschicht-Chromatographie wurde auch eine Polyacrylamidgel-Elektrophorese zur Überprüfung der Wirksamkeit der einzelnen Reinigungsvorgänge herangezogen (Abbildung. 5) und dadurch ein weiterer Hinweis auf die Einheitlichkeit der letztlich isolierten Fraktion J erhalten.



Abbild. 5. Polyacrylamidgel-Elektrophorese von synthetischem Sekretin I; Gelsystem nach *Reisfeld*, pH 4.5, 10proz. Trenngel; Amidoschwarz-Färbung

Ein Vergleich der Aminosäure-Analysen der Hauptfraktionen B, G und J zeigte eine der fortschreitenden Reinigung entsprechende immer bessere Annäherung an die theoretischen Werte (Tab. 1). Besonders deutlich war an der Zunahme der Relativwerte für Arginin (bei gleichzeitiger Abnahme der Ornithin-Werte) eine successive Abtrennung derjenigen Nebenprodukte festzustellen (Anreicherung zum Teil in der Sephadex-Vorfraktion A), bei denen durch noch ungeklärte Veränderung der Guanidofunktion eines oder mehrerer Argininreste letztlich Ornithin im Analyseergebnis auftrat.

Tab. 1. Aminosäure-Analysen verschiedener „Vorsynthese-Sekretin-Fractionen“ nach saurer Hydrolyse

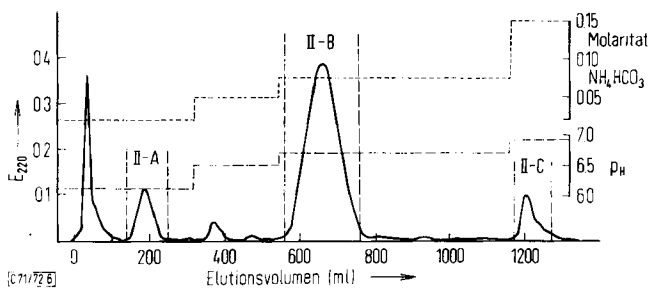
	„Roh-Sekretin I“	nach Reinigung durch					ber. Verh.
		Gelfiltration an Sephadex G-50	Elektrophorese	Ionenaustausch-Chromatographie an SP-Sephadex C-25			
		Frakt.: A	B	G	J	L	
His	0.87	0.87	0.76	0.90	0.90	0.89	1
Arg	3.36	2.89	3.40	3.89	3.98	4.04	4
Orn	0.51	0.68	0.36	0.32	0.06	0.10	—
Asp	1.93	2.08	1.83	2.01	2.10	2.00	2
Thr	2.07	2.44	1.77	1.90	1.95	1.08	2
Ser	4.20	4.85	3.77	3.98	4.00	2.33	4
Glu	3.20	3.40	3.00	3.05	3.03	2.15	3
Gly	1.92	1.92	1.77	1.98	2.05	1.97	2
Ala	1.00	1.00	1.00	1.00	1.03	1.01	1
Val	0.92	0.85	0.91	0.95	0.98	0.91	1
Leu	5.94	6.08	5.89	6.14	5.92	5.00	6
Phe	0.93	1.02	0.80	0.94	1.00	1.03	1

Die Analyse der isolierten Nebenkomponente 2 (Fraktion L) zeigte deutlich das Fehlen von fünf Aminosäuren (Thr 1, Ser 2, Glu 1, Leu 1) gegenüber der für Sekretin zu erwartenden Zusammensetzung. Dadurch war das Vorliegen der Fehlsequenz [1... 6-12... 27] bewiesen, die durch unvollständige Kondensation des Fragments [7-11] (NPS-Thr-Ser-Glu(OtBu)-Leu-Ser-OH) mit dem Fragment [12-27] und anschließende direkte Verknüpfung des Fragments [1-6] mit dem nicht umgesetzten Teilstück [12-27] entstanden sein könnte. Der Grund für die mangelhafte Umsetzung

der Aminogruppe des Arginins (Pos. 12) der Sequenz [12-27] mit der Kopfkomponente [7-11] dürfte eine konkurrierende zusätzliche Seitenketten-Acylierung in Fragment [12-27] sein, bedingt durch ein in diesem Material enthaltenes, noch unbekanntes Nebenprodukt; die erhöhten Werte für Thr, Ser, Glu und Leu in der Aminosäure-Analyse der ornithinreicheren, höhermolekularen Sephadex-Fraktion A deuten dies an.

Fortlaufend durchgeführte Bestimmungen der biologischen Aktivität durch Ermittlung der Dosis-Wirkungsbeziehung nach der Methode von *Lehnert et al.*⁴⁾ gaben ebenfalls deutliche Hinweise auf zunehmende Reinheit des synthetischen Sekretins. Während Rohsekretin etwa 25% der Aktivität des natürlichen Sekretins aufwies, lagen die Werte von Fraktion B bei ca. 35%, von Fraktion G bei ca. 60% und von hochgereinigter Endfraktion J bei ca. 75%.

In unserer Hauptsynthese, die aufgrund unserer Erfahrungen mit dem Produkt der „Vorsynthese“⁵⁾ in einigen Stufen geändert bzw. sorgfältiger als vorher überwacht worden war, konnten wir nach Abspaltung der Schutzgruppen ein Rohprodukt II (biologische Aktivität fast 50%) isolieren, das bedeutend bessere Voraussetzungen für die Reindarstellung des Sekretins aufzeigte. Lediglich eine einmalige Ionenaustausch-Chromatographie an SP-Sephadex C-25 genügte zur Abtrennung zweier vorhandener Nebenfraktionen und Gewinnung von reinem Sekretin (Fraktion II-B) in etwa 45proz. Ausbeute (Abbild. 6); Dünnschicht-Chromatographie (Abbild. 7) und Aminosäure-Analyse (Tab. 2) bestätigten die hohe Reinheit dieses Materials.



Abbild. 6. Ionenaustausch-Chromatographie von synthet. Heptacosapeptid-amid [1-27b] (Hauptsynthese)

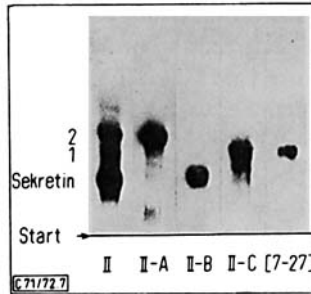
Die isolierten beiden Nebenfraktionen dürften aufgrund der Aminosäure-Analyse sein:

II-A, eine im Augenblick noch unbekannte, ninhydrin-negative Verbindung mit der Aminosäuresequenz 7-27;

II-C, zu etwa 50% ein unverändertes, ninhydrin-positives Fragmentmaterial [7-27b] der letzten Kondensationsstufe und zu ebenfalls etwa 50% eine wiederum noch unbekannte Verbindung mit einer Aminosäurezusammensetzung 1-27.

⁴⁾ P. Lehnert, H. Stahlheber, M. M. Forell, F. H. Dost, H. Fritz, M. Hutzel und E. Werle, *Klin. Wschr.* **47**, 1200 (1969).

⁵⁾ G. Wendberger, A. Högel, P. Thamm, R. Spangenberg und E. Wünsch, *Peptides 1971, Proc. XIth Europ. Peptide Symposium, Vienna 1971, North-Holland Publ. Co., im Druck.*

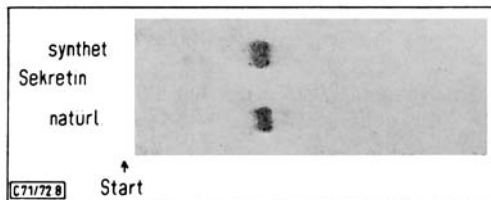


Abbild. 7. Dünnschicht-Chromatogramm der „Ionenaustausch-Chromatographie-Fractionen“ (Hauptsynthese). Kieselgel G; n-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60 : 6 : 24 : 20)

Tab. 2. Aminosäure-Analysen von synthet. Sekretin

	II (Roh-Sekretin)	II-A	II-B (Rein-Sekretin)	II-C	ber.
His	0.72	0.07	0.98	0.43	1
Arg	3.93	3.81	3.98	3.91	4
Asp	1.80	1.17	1.99	1.47	2
Thr	1.78	1.10	1.93	1.40	2
Ser	3.84	3.24	4.04	3.45	4
Glu	3.02	3.00	2.99	2.96	3
Gly	1.87	1.20	2.00	1.59	2
Ala	1.01	1.00	1.00	1.00	1
Val	0.98	0.95	0.99	1.01	1
Leu	6.00	5.96	6.02	6.10	6
Phe	0.83	0.15	0.98	0.50	1

Die biologische Aktivität des gefriergetrockneten synthetischen Heptacosapeptid-amids (II-B) wurde zu $100 \pm 5\%$ ⁶⁾ im Vergleich mit reinstem Jorpes-Mutt-Sekretin *) gefunden⁷⁾. Im chromatographischen Test (Abbild. 8) und bei analytischer Polyacryl-



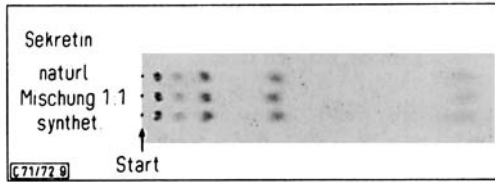
Abbild. 8. Chromatographischer Vergleich natürliches : synthetisches Sekretin; Kieselgel G; n-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60 : 6 : 24 : 20)

*) Für die Überlassung natürlichen Sekretins sowie für die Ausführung dieser Reinheitsteste sind wir Herrn Prof. V. Mutt, Karolinska Institut, Stockholm, zu Dank verpflichtet.

6) Fehlergrenze des Bestimmungsverfahrens, vgl. Dissertation P. Lehnert, Univ. München 1970.

7) P. Lehnert, H. Stahlheber, O. Roder, M. Zoelch, M. M. Forell, E. Wünsch, E. Jaeger und H. L. Martens, in Vorbereitung.

amidgel-Elektrophorese verhielt sich das synthetische Material identisch zu natürlichem Sekretin; ein Trypsin-Abbau*) an dem „synthetischen Reinsekretin“ nahm den erwünschten Verlauf: Die auftretenden fünf Peptidbruchstücke stimmten im Vergleich mit einem Enzymabbau an „natürlichem Hormon“ vollständig überein (Abbild. 9).



Abbild. 9. Trypsin-Abbau: Vergleich der Peptid-Bruchstücke aus natürlichem und synthetischem Sekretin bzw. einer 1:1-Mischung beider; Papierchromatogramm (absteigend); Whatman Nr. 42 Papier; n-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (30 : 6 : 24 : 20)

Für den absoluten Identitätsbeweis sollten weitere exakte physikalische Konstanten vorliegen: Diese können aber erst dann erbracht werden, wenn feststeht, daß natürliches Sekretin und das „synthetische“ Heptacosapeptid-amid in ihrem Aminosäure-Wasser-Salz-Gehalt prozentual übereinstimmen. Die Arbeiten hierzu sind im Gange.

Den *Farbwerken Hoechst AG*, der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* (Schwerpunktprogramm „Synthese makromolekularer Naturstoffe“) und dem *Fonds der Chemischen Industrie* gebührt für die Unterstützung unserer Arbeiten höchster Dank.

Beschreibung der Versuche

Die Aminosäure-Analysen wurden am „Automatic Amino Acid Analyzer“ der Fa. Beckman Instruments, Model 120 B, ausgeführt und mit einem Differential-Integrator, Mod. 125, ausgewertet. Die Extinktionsmessungen an den bei chromatographischen und elektrophoretischen Trennungen erhaltenen Lösungen erfolgten mit einem Spektralphotometer der Fa. Carl Zeiß, Mod. PMQ-II. Für die präparative elektrophoretische Reinigung diente ein Gerät der Fa. Bender und Hobein, Mod. Elphor VaP₂, und für die analytische Polyacrylamidgel-Elektrophorese eine P. A. G. E.-Apparatur der Fa. Quickfit Laborglas.

I. Reinigung von „Vorsynthese-Rohsekretin“

1. *Gelfiltration an Sephadex G-50*: In eine Säule (2 m × 4 cm) werden wie üblich 250 g in 0.5proz. Essigsäure mehrere Stunden gequollenes Sephadex G-50 (fine) gefüllt; darauf bringt man eine Lösung von 250 mg *Rohsekretin* in 20 ccm 0.5proz. Essigsäure, schlämmt mit 2 Portionen von je 20 ccm desselben Lösungsmittels ein und eluiert ebenfalls mit 0.5proz. Essigsäure bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 100 ccm/Stde. Das Eluat fängt man in Portionen von jeweils 25 ccm in den Zellen eines Fraktionssammlers auf und bestimmt die jeweilige Konzentration an Peptid durch Messung der Extinktion bei 230 nm. Die so erhaltene Elutionskurve (Abbild. 1) zeigt eine Auftrennung in mehrere Komponenten (A, B, C, D). Durch Lyophilisieren der Fraktionen 25–28 (100 ccm) werden 120 mg eines wasserhaltigen Materials isoliert (= Hauptfraktion B der Sephadex-Reinigung), das sich dünnschicht-chromatographisch als Mischung mehrerer Komponenten erweist (Abbild. 2).

2. *Trägerfreie kontinuierliche Elektrophorese*: Durch die Trennkammer einer VaP₂-Elektrophoreseapparatur wird 1.7proz. Essigsäure als Elektrolytlösung mit einer Durchlaufrate von 80 ccm/Stde. gepumpt. Bei 2800 V Klemmenspannung (entsprechend einer Feldstärke von 56 V/cm) und einem bei den gegebenen Bedingungen resultierenden Strom von 80 mA pumpt man mittels der Dosiereinrichtung eine Lösung von 50 mg der Sephadex-Fraktion B in 5 ccm Wasser innerhalb von 5 Stdn. in die links außen liegende Zufuhröffnung ein. Nach der Substanzeingabe wird der Durchfluß der Elektrolytlösung noch ca. 2 Stdn. fortgesetzt, bis das Vol. in jedem der insgesamt 50 Gläschen der Auffangkammer etwa 12 ccm beträgt. Man ermittelt die Peptidverteilung durch Extinktionsmessung bei 230 nm (Abbild. 3). Durch Lyophilisieren der Fraktionen 24–32 (= Fraktion G der Elektrophorese-Reinigung) werden 20 mg eines Peptidmaterials erhalten, dessen Dünnschicht-Chromatogramm (G in Abbild. 2) neben Sekretin (in Abbild. 2 als Komponente 3 bezeichnet) nur noch eine Hauptverunreinigung (Komponente 2 in Abbild. 2) erkennen läßt.

3. *Ionenaustausch-Chromatographie an SP-Sephadex C-25*: In eine Chromatographiesäule von 24 cm Länge und 0.9 cm Durchmesser wird ein wie üblich mit Startpuffer (0.02 *m* NH₄HCO₃-Lösung, durch Einleiten von CO₂ auf pH 6.1 eingestellt) äquilibrierter Ionenaustauscher SP-Sephadex C-25 (Ammoniumform) gefüllt. Man bringt eine Lösung von 20 mg der Elektrophorese-Fraktion G in 1 ccm 1proz. Essigsäure auf die Säule und eluiert mit dem Startpuffer bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 20 ccm/Stde. Nach Elution von 480 ccm (in 10-ccm-Portionen fraktioniert) wechselt man zu einem zweiten Puffer (0.05 *m* NH₄HCO₃/CO₂-Lsg., pH 6.5) und nach Elution von insgesamt 800 ccm zu einem dritten Puffer (0.1 *m* NH₄HCO₃/CO₂-Lsg., pH 6.8). Nach üblicher Ermittlung der Peptidverteilung mittels Extinktionsmessung lyophilisiert man die Fraktionen 56–69 (140 ccm) und erhält 12 mg wasserhaltiges, chromatographisch (s. Abbild. 2) und elektrophoretisch (s. Abbild. 5) einheitliches *Heptacosapeptid-amid* (= Hauptfraktion J der Ionenaustausch-Chromatographie).

II. Reinigung von „Hauptsynthese-Rohsekretin“

Ionenaustausch-Chromatographie an SP-Sephadex C-25: Auf eine, wie oben unter I, 3. beschrieben, gefüllte Chromatographiesäule bringt man eine Lösung von 100 mg „Hauptsynthese-Rohsekretin“ in 3 ccm 1proz. Essigsäure. Man eluiert in ähnlicher Weise nacheinander mit folgenden NH₄HCO₃/CO₂-Puffern: 1. 0.02 *m* NH₄HCO₃, pH 6.1; 2. 0.05 *m* NH₄HCO₃, pH 6.5; 3. 0.075 *m* NH₄HCO₃, pH 6.7; 4. 0.15 *m* NH₄HCO₃, pH 6.9 (vgl. Abbild. 6). Durch dreimaliges Lyophilisieren (zweimal aus 1proz. Essigsäure) der Hauptfraktion II-B werden 48 mg reines, wasserhaltiges *Sekretin* isoliert. Chromatographisch rein bei Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G und bei Papierchromatographie (aufsteigend) auf Whatman I-Papier in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60 : 6 : 24 : 20); elektrophoretisch rein bei Polyacrylamidgel-Elektrophorese im Gelsystem nach Reisfeld, pH 4.5.

[71/72]