

Beitrag zur Synthese des Sekretins

Georg Jäger, Wolfgang König, Hans Wissmann und Rolf Geiger*)

Farbwerke Hoechst AG, vormals Meister Lucius & Brüning,

D-6230 Frankfurt/M-Höchst, Postfach 800320

Eingegangen am 16. August 1973

Sekretin, das die Sequenz

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

besitzt, wurde durch Fragmentkondensation hergestellt. Als Kondensationsmittel diente Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazol¹⁾ oder 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin²⁾. Beim Aufbau von Fragmenten wurde die Beschleunigung der Aminolyse aktivierter Ester durch 1-Hydroxybenzotriazol erprobt^{3,4)}. Einige Probleme der Sekretinsynthese werden diskutiert.

Contribution to the Synthesis of Secretin

Secretin having the sequence

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

has been synthesized by fragment condensation. The condensation was achieved by dicyclohexylcarbodiimide in the presence of 1-hydroxybenzotriazole¹⁾ or 3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazine²⁾. The catalytic effect of 1-hydroxybenzotriazole on the aminolysis of active esters^{3,4)} was applied in the synthesis of intermediates. Some problems of the synthesis of secretin are discussed.

Die auf *Schwyz* zurückgehende Strategie, bei der Synthese höherer Peptide zum Schutz von Drittfunktionen der Aminosäuren protonensolvolytisch leicht abspaltbare Reste wie die *tert*-Butyloxycarbonyl-Gruppe (Boc) oder *tert*-Butylreste (Bu^t) zu verwenden, führte in ihrer konsequentesten Anwendung unter möglichst vollständigem Seitenkettenschutz zu erfolgreichen Synthesen von Glucagon und Sekretin durch *Wünsch* und Mitarbb.^{5,6)}

1) W. König und R. Geiger, Chem. Ber. 103, 788 (1970).

2) W. König und R. Geiger, Chem. Ber. 103, 2034 (1970).

3) W. König und R. Geiger in J. Meienhofer, Chemistry and Biology of Peptides, S. 343, Ann Arbor Science Publishers, Inc., Michigan 1972.

4) W. König und R. Geiger, Chem. Ber. 106, 3626 (1973).

5) E. Wünsch, Z. Naturforsch. 22B, 1269 (1967).

6) E. Wünsch, Naturwissenschaften 59, 239 (1972).

Eine wichtige Entdeckung von *Wünsch* war die mit *Weygand* ausgearbeitete Beobachtung, daß ein Zusatz von *N*-Hydroxysuccinimid (HONSu) bei der Kondensation von Peptidfragmenten mit racemisierungsgefährdeter *C*-terminaler Aminosäure mittels Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI) die Racemisierung auf ein Minimum zurückdrängen kann⁷⁾.

Im Verlauf von Studien über die Carbodiimidmethode konnten wir zeigen, daß die Verringerung der Racemisierung durch Zusätze bei der Kondensation mit DCCI eine allgemeine Eigenschaft bestimmter *N*-Hydroxyverbindungen ist. Unter ihnen verdienen 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) und 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin (HOOBT) besonderes Interesse^{1, 2)}.

HOBT erleidet auch bei längerdauernden Reaktionen keine irreversiblen Veränderungen durch DCCI, senkt die Racemisierung besonders wirksam und erlaubt auch die Kondensation von Peptidfragmenten an *C*-terminalem Glutamin¹⁾. Es hat sich bereits bei vielen Synthesen höherer Peptide bewährt.

HOOBT wurde bisher selten angewandt. Es senkt aber die Racemisierung selbst in extrem racemisierungsempfindlichen Testpeptiden sehr wirksam und vor allem auch dann, wenn ein Peptidfragment voraktiviert werden muß⁸⁾. Eine solche Voraktivierung ist erforderlich, wenn die Aminkomponente eine freie Carboxylgruppe besitzt oder wenn z. B. nach einer Hydrierung in Essigsäure ein geringer Rückstand an Essigsäure nicht auszuschließen ist, der die Bildung von *N*-Acetylpeptid als Nebenprodukt bewirken würde. Eine solche Gefahr besteht vor allem beim Arbeiten im Technikumsmaßstab.

Eine weitere interessante Eigenschaft des 1-Hydroxybenzotriazols war erst kürzlich entdeckt worden: Es katalysiert die Aminolysegeschwindigkeit aktivierter Ester wie 4-Nitrophenylester oder 2,4,5-Trichlorphenylester so stark, daß die Reaktion mit mehrhundertfacher Geschwindigkeit abläuft und viele Peptidsynthesen schon in Minuten beendet sind^{3, 4)}. Mit dieser Reaktion sollten vor allem Peptidfragmente rasch durch stufenweisen Aufbau hergestellt werden können.

Die Synthese einer größeren Menge Sekretin für pharmakologische Versuche war deshalb eine willkommene Gelegenheit, die beiden letzteren Methoden, über die bei der Synthese höherer Peptide noch kaum Erfahrungen vorlagen, zu erproben.

Bisher sind drei Synthesen des Sekretins beschrieben worden, zwei 1967 und 1968 von *Bodanszky*, *Ondetti* und Mitarbb.^{9, 10)} sowie kürzlich eine weitere von *Wünsch* und Mitarbb.^{6, 11-16)}.

⁷⁾ *F. Weygand, D. Hoffmann und E. Wünsch, Z. Naturforsch. 21 B, 426 (1966).*

⁸⁾ *W. König und R. Geiger, Chem. Ber. 103, 2024 (1970).*

⁹⁾ *M. Bodanszky, M. A. Ondetti, S. D. Levine und N. J. Williams, J. Amer. Chem. Soc. 89, 6753 (1967).*

¹⁰⁾ *M. A. Ondetti, V. L. Narayanan, M. von Saltza, J. T. Sheehan, E. F. Sabo und M. Bodanszky, J. Amer. Chem. Soc. 90, 4711 (1968).*

¹¹⁾ *E. Wünsch, G. Wendberger und A. Högel, Chem. Ber. 104, 2430 (1971).*

¹²⁾ *E. Wünsch, G. Wendberger und P. Thamm, Chem. Ber. 104, 2445 (1971).*

¹³⁾ *E. Wünsch und P. Thamm, Chem. Ber. 104, 2454 (1971).*

¹⁴⁾ *E. Wünsch, G. Wendberger und R. Spangenberg, Chem. Ber. 104, 3854 (1971).*

¹⁵⁾ *E. Wünsch und G. Wendberger, Chem. Ber. 105, 2508 (1972).*

¹⁶⁾ *E. Wünsch, E. Jaeger, M. Deffner, R. Scharf und P. Lehnert, Chem. Ber. 105, 2515 (1972).*

Um Nebenreaktionen zurückzudrängen, strebten wir einen möglichst vollständigen Schutz in den Seitenketten trifunktioneller Aminosäuren an. Auch Arginin wurde als $N^\alpha, N^\delta, N^\omega$ -Tris(benzyloxycarbonyl)arginin-Derivat eingesetzt. Damit waren die meisten Knüpfungsstellen vorgegeben, da Z-Arg(Z₂)-OH am sinnvollsten die *N*-terminale Aminosäure von Peptidfragmenten ist.

Auch *Wünsch* hatte dieses schon bei seiner Glucagon-Synthese bewährte Schema in die Synthese des Sekretins übernommen. So konnten wir uns häufig auf seine Erfahrungen stützen.

Der Aufbau des Sekretins in unserer Synthese ist aus Schema 1 ersichtlich.

Bei der Synthese des geschützten Tetradekapeptids (14–27) entsprachen die Knüpfungsstellen infolge der Verwendung von Fragmenten mit *N*-terminalem Arginin denen der Synthese von *Wünsch* und Mitarbb.

Beim Anknüpfen der Sequenz 7–13 durchbrachen wir dieses Schema und setzten Arginin von vornherein mit protonierter Guanidinogruppe ein. *N*²-Geschützte Peptide, die neben Arginin Aminosäuren mit lipophiler Seitenkette enthalten, lassen sich nämlich mit freier Guanidino- und Carboxylgruppe infolge ihrer Zwitterionenstruktur meist leicht reinigen.

Das Heneicosapeptid (7–27) ist wieder mit dem von *Wünsch* beschriebenen Fragment identisch, da keine Veranlassung bestand, die bewährte Knüpfungsstelle zwischen den Positionen 6 und 7 zu ändern.

Auch bei der Synthese des Fragments 1–6 konnten wir auf mehrere literaturbekannte Zwischenstufen zurückgreifen. Die Iminofunktion des Histidins blieb bei unserer Synthese jedoch frei.

Zum Verknüpfen der Aminosäuren und Peptide verwendeten wir fast ausschließlich das Carbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol-¹⁾ und Carbodiimid/3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin-Verfahren²⁾ sowie die Katalyse von Aktivestern^{3,4)}.

Die Sequenz 21–27 wurde wie bei *Wünsch* und Mitarbb.¹¹⁾ als $N^\alpha, N^\delta, N^\omega$ -Tris(benzyloxycarbonyl)arginyl-Derivat hergestellt, jedoch auf einem anderen Weg erhalten (s. Schema 2).

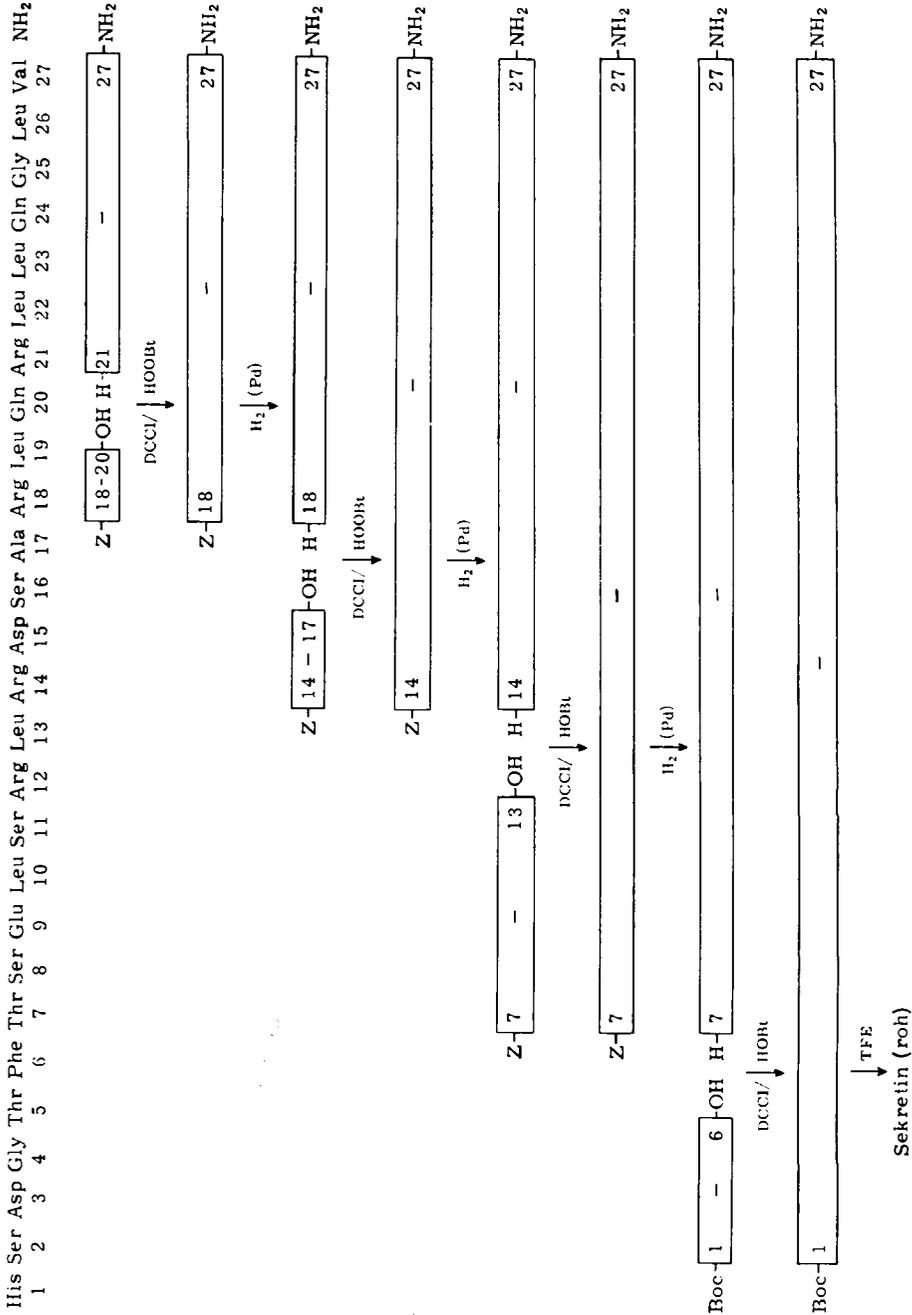
Z-Leu-Leu-Gln-OH (22–24)**b** wurde mit H-Gly-Leu-Val-NH₂ (25–27) kondensiert, weil wir bei *N*-terminalem Glycin nur geringe sterische Hinderung erwarteten und bei der Verknüpfung nach der DCCI/HOBT-Methode¹¹⁾ weder Racemisierung noch Dehydratisierung an der Amidfunktion des Glutamins befürchten mußten. Das Tripeptid H-Gly-Leu-Val-NH₂·HCl (25–27·HCl) wurde in sehr guter Ausbeute (78%, bezogen auf HBr·H-Val-NH₂) stufenweise unter Verwendung von Z-Leu-OPcp¹⁷⁾ und Z-Gly-OTcp¹⁸⁾ aufgebaut. Die Aminolyse wurde jeweils durch 1-Hydroxybenzotriazol katalysiert^{3,4)}. Das Tripeptid Z-Leu-Leu-Gln-OH (22–24)**b** wurde durch Verknüpfen von Z-Leu-Leu-OH (22–23)**b** mit H-Gln-OBu¹⁹⁾ nach der DCCI/HOBT-Methode¹⁾ (93% Ausb.) und anschließende Trifluoressigsäurebehandlung erhalten.

¹⁷⁾ G. Kupryszewski und M. Formela, Roczniki Chem. **35**, 1533 (1961).

¹⁸⁾ J. Pless und R. A. Boissonas, Helv. Chim. Acta **46**, 1609 (1963).

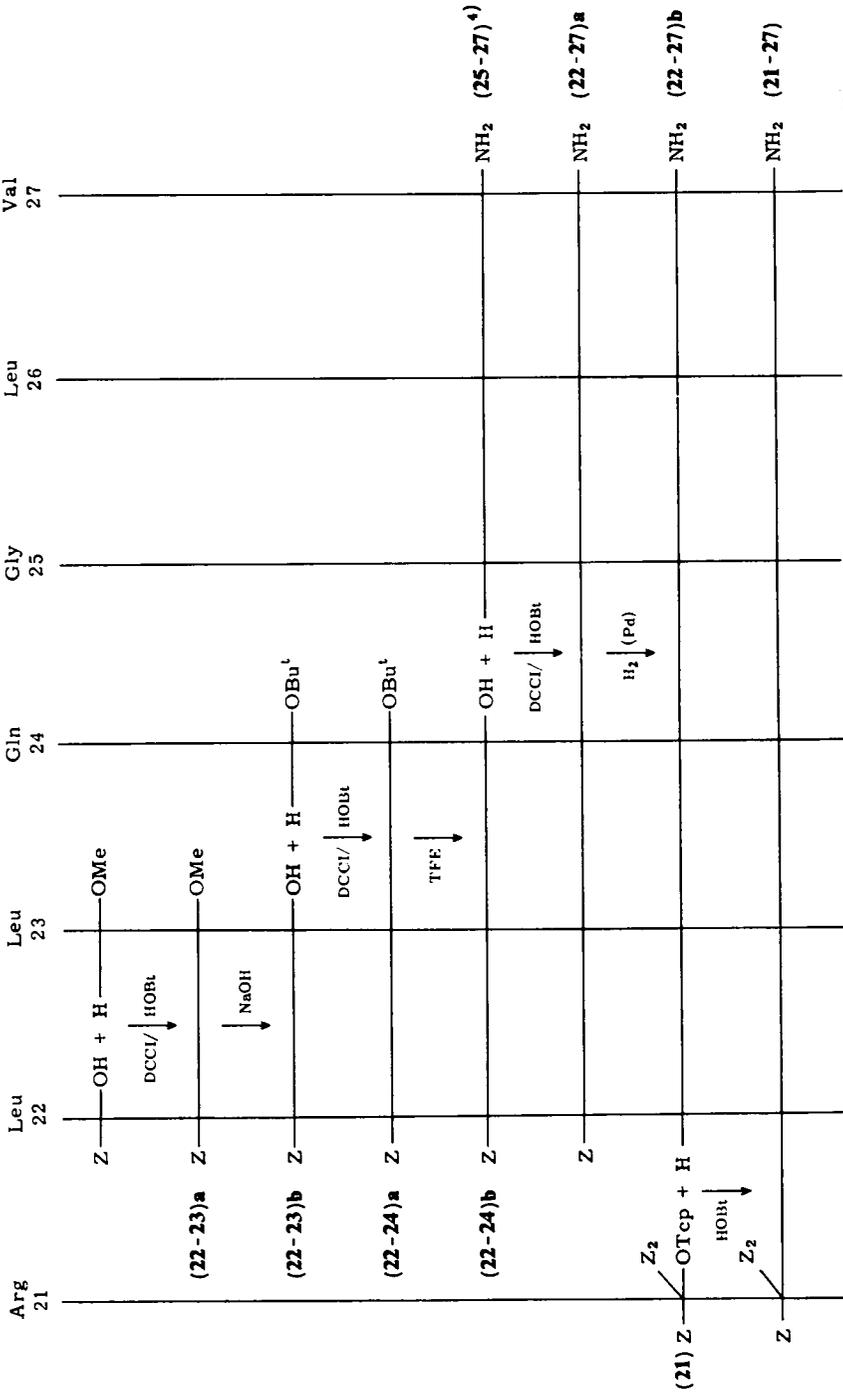
¹⁹⁾ R. Geiger, G. Jäger, W. König und G. Treuth, Chem. Ber. **106**, 188 (1973).

Schema 1. Aufbau der Gesamtsequenz 1—27 des Sekretins. Die funktionellen Gruppen in den Seitenketten der Fragmente sind geschützt (s. Schemata 2—4)*



* Abkürzungen entspr. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 256, 262 (1967). DCCl = Dicyclohexylcarbodiimid, HOObt = 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin, HOBt = 1-Hydroxybenzotriazol, TFE = Trifluoressigsäure, HONSu = N-Hydroxysuccinimid.

Schema 2. Synthese der Teilsequenz 21-27 des Sekretins. Tcp = 2,4,5-Trichlorphenyl-



Die Kondensation der beiden Tripeptide mittels DCCI/HOBt führte zu einem Cokristallat aus Z-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂ (**22–27**)**a** und Dicyclohexylharnstoff. Selbst durch Auskochen mit Methanol war der Dicyclohexylharnstoff nicht entfernbar. Erst nach Abspalten der Benzyloxycarbonylgruppe konnte er abgetrennt werden. Das Hexapeptidamid (**22–27**)**b** wurde als Acetat isoliert und charakterisiert.

Die folgende Stufe gestaltete sich besonders einfach. Das an sich schwerlösliche Hexapeptidamid-acetat (**22–27**)**b** löste sich leicht bei Zugabe eines Mols HOBt in Dimethylformamid. HOBt katalysierte gleichzeitig die Umsetzung mit dem Tris-Z-Arg-OTcp (**21**), so daß die Reaktion nach 5 Minuten beendet war. Bezogen auf Valinamid-hydrobromid betrug die Ausbeute an Tris-Z-heptapeptid (**21–27**) 46.5%. Das Peptid wurde in Essigsäure in Gegenwart von Palladium/Bariumsulfat hydriert und die freiwerdende α -Amino- und Guanidinogruppe des Arginins mit Bromwasserstoff neutralisiert.

Das hydrierte Heptapeptid der Sequenz 21–27 wurde mit dem mit DCCI/HOObt²⁾ voraktivierten Tripeptid Z₃-Arg-Leu-Gln-OH¹¹⁾ umgesetzt. Die Ausbeute an chromatographisch reinem, geschütztem Dekapeptid (**18–27**) war mit 78% höher als nach der DCCI/HOBt-Methode (70%). Der optische Drehwert war derselbe.

Das analog Lit.¹¹⁾ hydrierte Dekapeptid kondensierten wir nun mit dem Tetrapeptid Z₃-Arg-Asp(OBu^t)-Ser(Bu^t)-Ala-OH¹²⁾, wobei wir die Carboxylkomponente wiederum nach der DCCI/HOObt-Methode voraktivierten. Das geschützte Tetradekapeptid (**14–27**) wurde in einer Ausbeute von 88% erhalten (Lit.¹²⁾ 76% nach dem DCCI/HONSu-Verfahren⁷⁾).

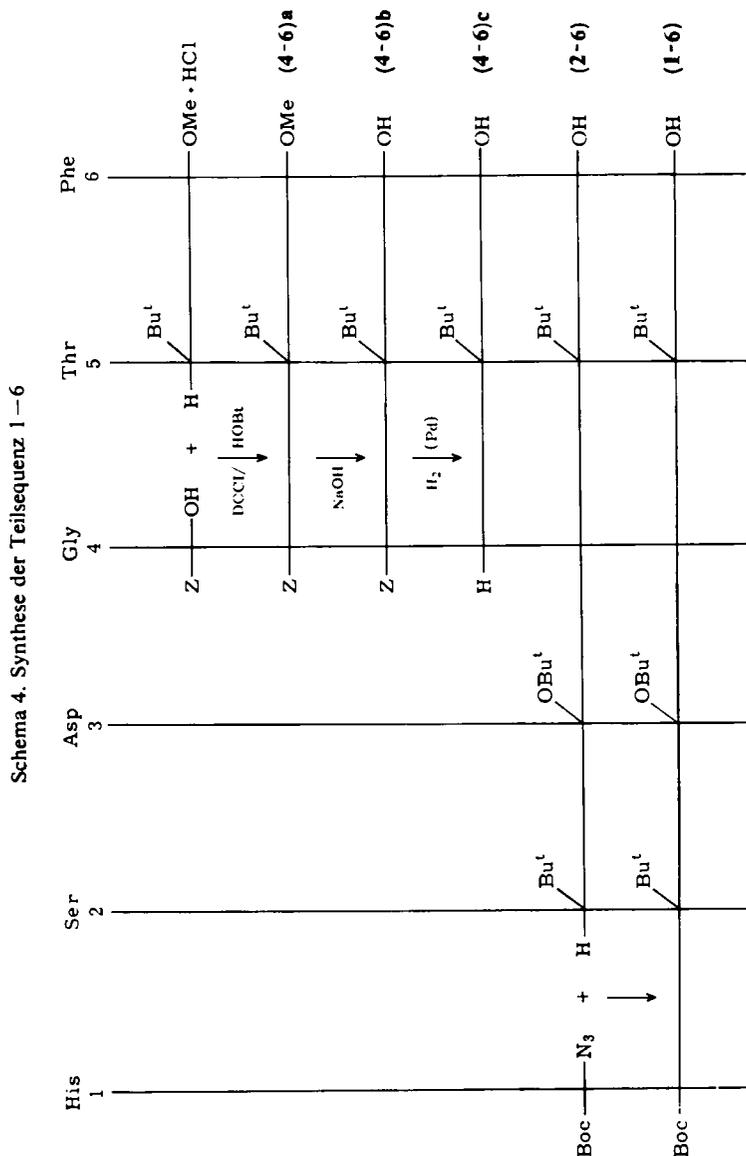
Nach katalytischer Hydrierung des Tetradekapeptids wurden die α -Amino- sowie die Guanidinofunktion des Arginins mit Bromwasserstoff protoniert¹²⁾. Das in 94proz. Ausbeute erhaltene acetatfreie H-Arg(HBr)-Asp(OBu^t)-Ser(Bu^t)-Ala-Arg-(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂ ($[\alpha]_D^{25}$: -33.7° ; Lit.¹²⁾ -32.1°) wurde nun direkt mit dem Heptapeptid Z-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Leu-Ser(Bu^t)-Arg(HBr)-Leu-OH (**7–13**) nach der „Eintopfmethode“ mit DCCI/HOBt¹⁾ umgesetzt. Das geschützte Heneikosapeptid (**7–27**)**a** erhielten wir in 76proz. Ausbeute; $[\alpha]_D^{25}$ = -26.6° (Lit. -22.1° ¹⁵⁾).

Schema 3 zeigt die Synthese des Heptapeptids (**7–13**). Es wurde aus den Teilstücken 7–10 und 11–13 zusammengesetzt.

Bei der Synthese des Tripeptids der Sequenz 11–13 wurde auf einen Schutz der Guanidinofunktion des Arginins verzichtet. Dies hatte den Vorteil, daß nach Verseifung des öligen Tripeptidmethylesters (**11–13**)**a** die Säure (**11–13**)**b** infolge der Bildung eines Zwitterions in kristalliner Form anfiel. Das Tetrapeptid der Sequenz 7–10 wurde stufenweise nach der Eintopfmethode mit DCCI/HOBt¹⁾ aufgebaut, der erhaltene Tetrapeptid-methylester (**7–10**)**a** vorsichtig zur Säure Z-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Leu-OH (**7–10**)**b** verseift, die nach Voraktivieren mit DCCI/HOObt²⁾ und Umsetzen mit H-Ser(Bu^t)-Arg-Leu-OH (**11–13**)**c** das Heptapeptid (**7–13**) lieferte.

In der letzten Fragmentkondensation benutzten wir als Teilstück das Hexapeptid Boc-His-Ser(Bu^t)-Asp(OBu^t)-Gly-Thr(Bu^t)-Phe-OH (**1–6**), das nach der Eintopf-

methode¹⁾ mit dem durch katalytische Hydrierung in Methanol/Dimethylacetamid von der *N*^α-Benzyloxycarbonylgruppe befreiten Heneikosapeptid (7–27)**b** umgesetzt wurde. Die Synthese des Hexapeptids (1–6) veranschaulicht Schema 4.



Der nach der DCCI/HOBt-Methode¹⁾ in hoher Ausbeute und Reinheit erhaltene voll geschützte feste Tripeptidester (4–6)**a** wurde zur Säure (4–6)**b** verseift. Bei dieser Synthese wurden beide Verbindungen in fester Form erhalten.

Der weitere Aufbau der Sequenz folgte bis zum Pentapeptid dem Syntheseweg von *Wünsch*¹⁴⁾. Die nachfolgende Umsetzung mit Boc-His-N₃ führte schließlich zum geschützten Hexapeptid (1–6).

Das geschützte Sekretin (1–27) wurde durch Behandlung mit wasserfreier Trifluoressigsäure von allen Schutzgruppen befreit und das entstandene Heptakosapeptid-hydrobromid-trifluoacetat mittels Amberlite IR-45 (Acetatform) in das Acetat übergeführt. Zur Reinigung des Rohprodukts bedienten wir uns der Ionenaustausch-Chromatographie an SP-Sephadex C-25 nach *Wünsch*¹⁶⁾, da Versuche, das Rohprodukt an Sephadex LH-20 unter Verwendung von 0.1 N Essigsäure als Elutionsmittel zu reinigen, unbefriedigend verliefen.

Das rohe Sekretin-acetat wurde ohne weiteres Vorreinigen oder Lyophilisieren sofort auf die SP-Sephadex C-25-Säule gegeben. Auf diese Weise versuchten wir die Inaktivierung des Sekretins in Grenzen zu halten, denn nach unseren Beobachtungen verliert Sekretin in wässriger Lösung rasch an Aktivität. Auch *Grossman*²⁰⁾ berichtete, daß Sekretin selbst in fester Form unbeständig sei.

Während *Wünsch* die Elution mit einem Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer vom pH 6.1 beginnt und anschließend nacheinander Puffer vom pH 6.5, 6.7 und 6.9 einsetzt, benutzten wir nur die drei letztgenannten Puffer und erzielten eine gute Reinigung; das nach Gefriertrocknung erhaltene Sekretin war nach Anfärben mit Ninhydrin, Paulys und Reindel-Hoppes Reagenz chromatographisch rein und biologisch voll aktiv.

Zur Erhöhung der Stabilität legten wir zunächst bei der Säulentrennung in den Auffanggefäßen vorsichtshalber Cystein-hydrochlorid-Lösung vor, in die das Eluat eintropfte²¹⁾. Nach dieser Methode wurde das Rohsekretin in Chargen von jeweils ca. 3 g gereinigt.

Das rohe Sekretin-hydrobromid-trifluoacetat-hydrat der ersten Synthese zeigte im biologischen Test an Hunden eine Aktivität von 1000–1200 klin. E./mg. Bei späteren Synthesen stieg die biologische Wirkung auf etwa 1500 klin. E./mg an. Eine Probe des rohen Acetats besaß nach Lyophilisieren und Trocknen etwa 1800 klin. E./mg. Die Hauptfraktionen der an SP-Sephadex gereinigten Sekretinchargen enthielten 3800–4000 klin. E./mg (bezogen auf Peptid-Base). Da aus Gründen der Stabilität die Eluate der SP-Sephadex-Säule nur einmal gefriergetrocknet wurden, enthielten die Lyophilisate außer vorgelegtem Cystein-hydrochlorid noch wechselnde Mengen an Ammoniumsalzen (Ammoniumchlorid); der Peptidgehalt wurde deshalb über quantitative Aminosäureanalysen ermittelt und schwankte zwischen 5 und 10%.

Aus 3.0 g Rohsekretin-tetrahydrobromid-bis(trifluoacetat)-hydrat mit etwa 1200 klin. E./mg wurden insgesamt etwa 0.55 g Reinsekretin-Base mit 3800–4000 klin. E./mg erhalten; dies entspricht für die Reinigung einer Ausbeute von ca. 60%, d. h. einem Verlust von ca. 40% unter Zugrundelegung von 4000 klin. E./mg für reines Sekretin.

Die Aminosäureanalysen der Hauptfraktionen stimmten mit den berechneten Werten gut überein.

²⁰⁾ *M. I. Grossman*, *Gastroenterology* **57**, 767 (1969).

²¹⁾ Auch das vom Karolinska Institut, Stockholm, vertriebene natürliche Sekretin enthält Cystein-hydrochlorid, vgl. ²⁰⁾.

Da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, daß der Zusatz von Cystein-hydrochlorid die Stabilität des Sekretins in Lösung nicht merklich verbessert und andererseits auch reines Sekretin-acetat in trockener Form zumindest über kürzere Zeit hinreichend stabil ist, wurde in einem weiteren Versuch auf die Vorgabe von Cystein-hydrochlorid in den Auffanggefäßen verzichtet und nach zweimaliger Gefriertrocknung aus essigsaurer Lösung Sekretin-acetat-hydrat mit etwa 3600 klin. E./mg erhalten. Die Ausbeute-Bilanz war unverändert.

Mit der hier beschriebenen Sekretinsynthese haben wir versucht, neuere Kondensationsmethoden bei der Synthese eines höheren Peptids einzusetzen. Dabei wurden an mehreren Stellen „Technikumsbedingungen“ simuliert, um sicherzustellen, daß diese Methoden auch für die Herstellung von Peptiden in größerem Maßstab brauchbar sind. Der gelungene Beweis war vor allem für die Voraktivierung racemisierungsgefährdeter Peptid-fragmente wichtig; in einigen Fällen konnten hierbei sogar die sehr guten Ausbeuten von *Wünsch* und Mitarbb. weiter verbessert werden.

Problematisch ist noch immer die Einführung von Arginin. Für Laboratoriumssynthesen scheint das Problem durch die Verwendung von Z-Arg(N^{δ}, N^{ω} -Z,Z)-OH oder dessen Aktivester befriedigend gelöst zu sein. Die Herstellung dieses Arginin-derivats in größerem Maßstab ist aber wegen der schlechten Ausbeute unerfreulich. Deshalb haben wir bei der Darstellung der Sequenz 7–13 auf das leicht zugängliche Z-Arg-OH zurückgegriffen. Der Erfolg dieser Maßnahme wird uns bei einer späteren Synthese ermutigen, diese Technik nach Möglichkeit auf die anderen Argininreste auszuweiten, was allerdings eine weitgehende Umstellung der Synthese zur Folge hätte.

Im Zusammenhang mit dem Anbau der Sequenz 7–13 sind noch zwei Beobachtungen anzumerken. Wir hatten zunächst versucht, Thr⁷ ohne Seitenkettenschutz einzusetzen, mußten aber die Erfahrung machen, daß dann die Benzyloxycarbonylgruppe nicht vom geschützten Peptid Z-(7–27) abzuhydrieren war. Dieselbe Schwierigkeit trat auf, als versucht worden war, das geschützte Tripeptid Z-(11–13)-OH an die Sequenz 14–27 anzukondensieren und anschließend die Benzyloxycarbonylgruppe von Z-(11–27) durch katalytische Hydrierung zu entfernen. Dieses Verhalten war nicht vorhersehbar und zeigt, an welcher unerwarteten Schwierigkeiten ein Syntheseplan oft scheitern kann.

Boc-His-N₃ war schon von *Ondetti* und Mitarbb.¹⁰⁾ zur Einführung dieser Aminosäure benützt worden. Beim Vergleich der Ausbeuten in der letzten Stufe der Sekretinsynthese unter Verwendung von *N*^{imm}-geschütztem und -ungeschütztem Histidin beobachteten wir keinen signifikanten Unterschied.

Für die Reinigung des Roh-Sekretins in größerem Maßstab haben wir noch keine voll befriedigende Lösung gefunden. Von den chromatographischen Verfahren bewährte sich bisher nur die Trennung durch Ionenaustausch-Chromatographie nach *Wünsch*¹⁶⁾, bei der aber bei der Vergrößerung des Maßstabs Verluste an Sekretin unvermeidlich scheinen. Möglicherweise lassen sich diese Verluste bei der Reinigung durch Gegenstromverteilung¹⁰⁾ in Grenzen halten.

Herrn Dr. *R. Schleyerbach* aus unserer Abteilung für Pharmakologie gebührt unser aufrichtigster Dank für die Bestimmung der biologischen Aktivitäten; ferner danken wir Herrn *H. Klumpp* für seine wertvolle Mitarbeit bei den säulenchromatographischen Trennungen.

Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden im Apparat nach Dr. Tottoli bestimmt und sind nicht korrigiert. Die spez. Drehwerte wurden im Polarimeter 141 von Perkin-Elmer gemessen. Die Reinheitsprüfung der Substanzen erfolgte dünn-schichtchromatographisch auf Fertigplatten (Kieselgel F) der Fa. E. Merck, wobei u. a. folgende Systeme benutzt wurden:

Methyläthylketon/Pyridin/Wasser/Essigsäure (70:15:15:2); n-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1); n-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (30:6:24:20); Chloroform/Methanol (8:3).

Die Aminosäure-Analysen wurden nach 24stdg. Hydrolyse mit 6 N HCl (bei 120°C) mit einem Beckman-Aminosäure-Analysator Unichrom vorgenommen.

Alle Produkte wurden i. Hochvak. über P₂O₅ getrocknet. Das Ansäuern und Waschen erfolgte in vielen Fällen mit einer wäßrigen Lösung von KHSO₄/K₂SO₄ (1:2) nach *Wünsch*²²⁾, im folgenden „KHSO₄-Lösung“ genannt.

Abkürzungen:

DCCI Dicyclohexylcarbodiimid

HOBt 1-Hydroxybenzotriazol

HOObt 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin

Teilsequenz 21–27

Z-Leu-Leu-OMe (22–23)a: Zu einer Lösung von 132.6 g (500 mmol) Z-Leu-OH²³⁾, 90.8 g (500 mmol) HCl·H-Leu-OMe²⁴⁾ und 67.5 g (500 mmol) HOObt in 1 Liter DMF gibt man 65 ml (500 mmol) *N*-Äthylmorpholin und bei 0°C eine Lösung von 110 g DCCI in 200 ml DMF. Man läßt 1 h bei 0°C und 1 h bei Raumtemp. rühren, saugt den Niederschlag ab und engt das Filtrat i. Hochvak. ein. Der Rückstand wird zwischen Essigester und Wasser verteilt und die Essigesterphase nacheinander mit gesätt. NaHCO₃-Lösung, 2 N HCl, gesätt. NaHCO₃-Lösung und Wasser ausgeschüttelt, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wird mit Petroläther verrieben und abgesaugt. Ausb. 147 g, Schmp. 90°C. Zur weiteren Reinigung wird die Substanz in Essigester gelöst und über 450 g bas. Al₂O₃ chromatographiert. Elution mit Essigester. Das Eluat wird eingeeengt und der Rückstand mit Petroläther verrieben. Ausb. 135 g (69%). Schmp. 96°C (Lit.²⁵⁾ 97.5–98.5°C).

Z-Leu-Leu-OH (22–23)b: 33.7 g (85.9 mmol) Z-Leu-Leu-OMe (22–23)a werden in 140 ml Dioxan und 35 ml Wasser gelöst und mit 86 ml 1 N NaOH versetzt. Nach 2stdg. Rühren bei Raumtemp. neutralisiert man mit 2 N HCl, engt ein und verteilt den Rückstand zwischen Essigester und 1 N HCl. Die Essigesterphase wird mit Wasser ausgeschüttelt, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wird mit Petroläther verrieben und abgesaugt. Aus Essigester/Petroläther Ausb. 27.9 g (86%), Schmp. 95–97°C (Lit.²⁵⁾ 98–101°C).

Z-Leu-Leu-Gln-OBu¹ (22–24)a: Zu einer Lösung von 75.6 g (200 mmol) Z-Leu-Leu-OH (22–23)b, 47.6 g (200 mmol) HCl·H-Gln-OBu¹¹⁹⁾ und 27 g (200 mmol) HOObt in 400 ml DMF gibt man bei 0°C 26 ml *N*-Äthylmorpholin und eine Lösung von 44 g DCCI in 100 ml DMF. Man läßt 1 h bei 0°C und 1 h bei Raumtemp. rühren, saugt vom Niederschlag ab und engt das Filtrat i. Vak. ein. Der Rückstand wird nacheinander mit NaHCO₃-Lösung, KHSO₄-Lösung, NaHCO₃-Lösung und Wasser verrührt und abgesaugt. Das Produkt wird in

²²⁾ R. Spangenberg, P. Thamm und E. Wünsch, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **352**, 655 (1971).

²³⁾ G. Losse und E. Demuth, Chem. Ber. **94**, 1762 (1961).

²⁴⁾ M. Brenner und W. Huber, Helv. Chim. Acta **36**, 1109 (1953).

²⁵⁾ E. L. Smith, D. H. Spackman und W. J. Polglase, J. Biol. Chem. **199**, 801 (1952).

Essigester heiß gelöst, die Lösung mit Na_2SO_4 heiß getrocknet und eingeengt, der Rückstand mit Äther verrieben, abgesaugt und i.Vak. getrocknet. Ausb. 105 g (93%), Schmp. 178 bis 180°C , $[\alpha]_D^{25} = -25.6^\circ$ ($c = 1$, in Dimethylacetamid).

$\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_7$ (562.8) Ber. C 61.90 H 8.24 N 9.96 Gef. C 61.7 H 8.9 N 9.8

Z-Leu-Leu-Gln-OH (22–24)**b**: 105 g (186.7 mmol) *Z-Leu-Leu-Gln-OBu^t* (22–24)**a** werden in 300 ml Trifluoressigsäure bei Raumtemp. gelöst. Man läßt 30 min bei Raumtemp. stehen, engt bei 20°C Badtemp. i.Vak. ein und verreibt den Rückstand mit Äther. Ausb. 97 g, Schmp. $170-173^\circ\text{C}$. Zur Reinigung wird aus Essigester/Petroläther umgefällt, dann mit Wasser aufgeköcht und heiß abgesaugt. Ausb. 77 g (81%), Schmp. $198-200^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D^{25} = -16.8^\circ$ ($c = 1$, in Dimethylacetamid).

$\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_7$ (506.6) Ber. C 59.27 H 7.56 N 11.06 Gef. C 59.2 H 7.5 N 11.2

Z-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂ (22–27)**a**: Zu einer Lösung von 63 g (125 mmol) *Z-Leu-Leu-Gln-OH* (22–24)**b**, 40.5 g (125 mmol) $\text{HCl}\cdot\text{H-Gly-Leu-Val-NH}_2^{4)}$ und 16.9 g (125 mmol) HOBt in 40 ml DMF gibt man bei 0°C 16.3 ml *N*-Äthylmorpholin und eine Lösung von 27.5 g DCCI in 100 ml DMF. Man läßt 1 h bei 0°C und 1 h bei Raumtemp. rühren, saugt den Niederschlag ab und fällt mit Eiswasser aus dem Filtrat ein kristallines Produkt. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit NaHCO_3 -Lösung verrieben, wieder abgesaugt, gut mit Wasser gewaschen, über P_2O_5 getrocknet und mit Methanol aufgeköcht. Man läßt auf Raumtemp. abkühlen und saugt ab. Das Produkt ist nach dem Dünnschichtchromatogramm in Methylchlorid/Methanol (9:1) und der Analyse ein Cokristallisat aus 1 mol *Z-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂* und 1 mol Dicyclohexylharnstoff. Ausb. 103.5 g (83%), Schmp. $228-230^\circ\text{C}$ (Zers.), $[\alpha]_D^{25} = -33.6^\circ$ ($c = 1$, in Eisessig).

$\text{C}_{38}\text{H}_{62}\text{N}_8\text{O}_9 + \text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}$ (999.3) Ber. C 61.30 H 8.68 N 14.02
Gef. C 61.4 H 8.5 N 13.9

H-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂-acetat-monohydrat (22–27)**b**: 100 g (100 mmol) *Z-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂-Dicyclohexylharnstoff-Cokristallisat* (22–27)**a** werden in 1.7 Liter 90proz. Essigsäure suspendiert und katalytisch hydriert. Wenn kein CO_2 mehr freigesetzt wird, wird der Katalysator abgesaugt und das Filtrat eingeengt. Der Rückstand wird mit Essigester aufgeköcht und heiß abgesaugt, der Niederschlag getrocknet und 2mal mit je 2 Liter warmem Wasser verrieben. Von Unlöslichem wird abgesaugt und das Filtrat gefriergetrocknet. Ausb. 59.0 g (82%); $[\alpha]_D^{25} = -27.3^\circ$ ($c = 1$, in Essigsäure).

$\text{C}_{30}\text{H}_{56}\text{N}_8\text{O}_7\cdot\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (718.9) Ber. C 53.45 H 8.69 N 15.59
Gef. C 53.4 H 8.7 N 15.7

Z-Arg(Z₂)-OTcp (21): Die Lösung von 139.4 g (242 mmol) *Z-Arg(Z₂)-OH*²⁶⁾ und 47.8 g (242 mmol) 2,4,5-Trichlorphenol in 400 ml Tetrahydrofuran wird bei 0°C mit 52.8 g DCCI versetzt. Man rührt 1 h bei 0°C und 2 h bei Raumtemp., saugt nach Abkühlen vom Dicyclohexylharnstoff ab, dampft das Filtrat i.Vak. ein und kristallisiert den Rückstand 2mal aus Isopropylalkohol um. Ausb. 141.9 g (78%), Schmp. $124-126^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} = -8.6^\circ$ ($c = 1$, in THF).

$\text{C}_{36}\text{H}_{33}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}_8$ (756.1) Ber. C 57.19 H 4.40 N 7.41 Gef. C 57.4 H 4.3 N 7.2

Z-Arg(Z₂)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂ (21–27): 7.19 g (10 mmol) *H-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂-acetat-monohydrat* (22–27)**b** und 1.35 g (10 mmol) HOBt werden in 60 ml DMF gelöst. Dazu gibt man 7.60 g *Z-Arg(Z₂)-OTcp* (21). Nach 5 min Rühren wird i.Vak. eingeengt und der Rückstand mit NaHCO_3 -Lösung verrieben, abgesaugt und mit

²⁶⁾ E. Wünsch und G. Wendberger, Chem. Ber. **100**, 160 (1966).

Wasser gewaschen. Die Rohsubstanz wird getrocknet und mit Methanol ausgekocht. Man läßt auf Raumtemp. abkühlen, saugt ab und wäscht mit Äther nach. Ausb. 10.5 g (87.5%); Schmp. 254–257°C (Zers.) (Lit.¹¹⁾ 257°C, Zers.).

Teilsequenz 7–13

Z-Arg(HCl)-Leu-OMe (12–13)a: Die Suspension von 61.7 g (0.2 mol) *Z-Arg-OH*²⁷⁾ und 36.3 g (0.2 mol) *H-Leu-OMe·HCl*²²⁾ in 500 ml Pyridin und 250 ml DMF wird bei 0°C mit der Lösung von 41.3 g (0.2 mol) DCCI in 50 ml DMF versetzt. Man rührt 1 h bei 0°C und 12 h bei Raumtemp., saugt dann vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab und dampft das Filtrat i. Hochvak. ein. Den harzigen Rückstand nimmt man in Aceton auf, filtriert, engt das Filtrat auf ein kleines Volumen ein und versetzt mit Äther. Nach Dekantieren wird das schmierige Produkt mit Äther/Petroläther verrührt und aus Essigester kristallisiert. Ausb. 82.8 g (88%), Schmp. 122–124°C (Lit.²⁸⁾ 92–94°C); $[\alpha]_D^{25} = -23.1^\circ$ ($c = 1$, in Methanol) (Lit.²⁸⁾ -21.6°).

Z-Ser(Bu^t)-Arg-Leu-OH (11–13)b

a) 47.2 g (0.1 mol) *Z-Arg(HCl)-Leu-OMe (12–13)a* werden in 600 ml Methanol bei pH 4.5 unter Titration mit 1 N methanolischer HCl in Gegenwart von Palladium/BaSO₄ 2 h hydriert. Nach Filtration und Eindampfen behandelt man den Rückstand mit absol. Äther, saugt rasch ab und trocknet sofort über KOH und P₂O₅. Ausb. 37.5 g (100%) *H-Arg(HCl)-Leu-OMe·HCl (12–13)b*. Das stark hygroskopische Produkt wird direkt weiterverwendet.

b) 15.8 g (53.5 mmol) *Z-Ser(Bu^t)-OH*²⁹⁾ und 7.23 g (53.5 mmol) HOBt in 50 ml DMF werden bei 0°C mit 11.1 g (53.5 mmol) DCCI versetzt. Nach 1 h Rühren saugt man vom Dicyclohexylharnstoff ab und vereinigt das Filtrat mit der Lösung von 18.2 g (48.6 mmol) *H-Arg(HCl)-Leu-OMe·HCl (12–13)b* in 50 ml DMF. Nach Zugabe von 7.46 ml *N*-Äthylmorpholin und 12stdg. Rühren dampft man i. Hochvak. ein und behandelt den harzigen Rückstand, der ohne weitere Reinigung nach Trocknen verseift wird, mehrmals mit Äther. Ausb. 43.8 g rohes *Z-Ser(Bu^t)-Arg(HCl)-Leu-OMe (11–13)a*.

c) 43.8 g (\leq 48.6 mmol) roher Methylester *(11–13)a* werden in 210 ml Dioxan, 150 ml Wasser und 30 ml Methanol gelöst und unter Rühren bei pH 11–12 mit 1 N NaOH verseift. Nach Neutralstellen mit 1 N HCl engt man auf ein kleines Volumen ein, verreibt mit Wasser und kocht das kristalline Produkt mit Essigester aus. Ausb. 11.8 g. Aus der wäbr. Mutterlauge erhält man nach Einengen noch 3.0 g *(11–13)b*. Gesamtausb. 14.8 g (\geq 53%), Schmp. 228.5–229°C (Zers.), $[\alpha]_D^{25} = -4.9^\circ$ ($c = 1$, in Methanol).

C₂₇H₄₄N₆O₇·0.5 H₂O (573.7) Ber. C 56.53 H 7.91 N 14.65 Gef. C 56.9 H 7.9 N 14.7

H-Ser(Bu^t)-Arg-Leu-OH (11–13)c: 11.5 g (20 mmol) *Z-Ser(Bu^t)-Arg-Leu-OH (11–13)b* werden in 220 ml Methanol in Gegenwart von Palladium/BaSO₄ 5 h hydriert. Nach Entfernen des Katalysators und Eindampfen des Filtrats verreibt man den Rückstand mit Äther. Ausb. 8.3 g (91%); $[\alpha]_D^{25} = -10.8^\circ$ ($c = 1$, in Methanol).

C₁₉H₃₈N₆O₅·1.5 H₂O (457.6) Ber. C 49.87 H 9.03 N 18.37 Gef. C 50.0 H 9.0 N 18.0

Z-Glu(OBu^t)-Leu-OMe (9–10)a: 67.5 g (0.2 mol) *Z-Glu(OBu^t)-OH*³⁰⁾, 36.3 g (0.2 mol) *H-Leu-OMe·HCl*²⁴⁾ und 27.0 g (0.2 mol) HOBt werden in 160 ml DMF bei 0°C mit 41.3 g (0.2 mol) DCCI und 25.6 ml (0.2 mol) *N*-Äthylmorpholin versetzt. Nach 12stdg. Rühren

²⁷⁾ R. A. Boissonnas, St. Guttmann, R. L. Huguenin, P. A. Jaquenoud und Ed. Sandrin, Helv. Chim. Acta **41**, 1867 (1958).

²⁸⁾ R. W. Young, K. H. Wood, R. J. Joyce und G. W. Anderson, J. Amer. Chem. Soc. **78**, 2126 (1956).

²⁹⁾ E. Wünsch und A. Zwick, Chem. Ber. **99**, 105 (1966).

³⁰⁾ E. Schröder und E. Klieger, Liebigs Ann. Chem. **673**, 196 (1964).

bei Raumtemp. saugt man vom Niederschlag ab und dampft das Filtrat i. Hochvak. ein. Den Rückstand nimmt man in Essigester auf und wäscht die Lösung mit KHSO_4 - und NaHCO_3 -Lösung sowie mit Wasser. Die über Na_2SO_4 getrocknete Essigesterlösung dampft man i. Vak. ein und kristallisiert den festen Rückstand aus Diisopropyläther um. Ausb. 72.1 g (78%), Schmp. 50–52°C, $[\alpha]_D^{25} = -23.0^\circ$ ($c = 2$, in Äthanol).

$\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_7$ (464.6) Ber. C 62.05 H 7.81 N 6.03 Gef. C 62.0 H 7.8 N 6.4

Z-Ser(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Leu-OMe (8–10)a

a) 116.2 g (250 mmol) Z-Glu(OBu^t)-Leu-OMe (9–10)a werden in 300 ml Methanol bei pH 4.5 unter Zutropfen von 1 N HCl katalytisch hydriert. Ausb. 88.7 g (97%) H-Glu(OBu^t)-Leu-OMe · HCl (9–10)b.

b) Man löst 68.9 g (234 mmol) Z-Ser(Bu^t)-OH²⁹⁾ und 31.6 g (234 mmol) HOBt in 180 ml DMF und gibt nach Abkühlen auf 0°C 48.3 g (234 mmol) DCCI hinzu. Beim Rühren bei Raumtemp. erstarrt nach wenigen min der Kolbeninhalt. Man verdünnt die Suspension mit 50 ml DMF, rührt 1 h bei Raumtemp. und saugt vom Dicyclohexylharnstoff ab. Das Filtrat versetzt man mit obigen 88.7 g (242 mmol) H-Glu(OBu^t)-Leu-OMe · HCl (9–10)b sowie mit 31 ml (242 mmol) *N*-Äthylmorpholin. Nach 20stdg. Rühren bei Raumtemp. dampft man i. Hochvak. ein, löst den lackartigen Rückstand in Essigester, wäscht die filtrierte Lösung mit KHSO_4 - und NaHCO_3 -Lösung sowie mit NaCl-haltigem Wasser und trocknet über Na_2SO_4 . Der nach Eindampfen erhaltene feste Rückstand wird mit Diisopropyläther verrieben. Ausb. 105.2 g (74%), Schmp. 133–134°C, $[\alpha]_D^{25} = -24.1^\circ$ ($c = 1$, in Methanol).

$\text{C}_{31}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_9$ (607.8) Ber. C 61.26 H 8.13 N 6.91 Gef. C 61.3 H 8.2 N 6.8

Z-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Leu-OMe (7–10)a

a) 105.15 g (173 mmol) Z-Ser(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Leu-OMe (8–10)a hydriert man in 1 Liter Methanol in Gegenwart von Palladium/BaSO₄ unter Zutropfen von methanolischer HCl bei pH 4.5. Nach Filtrieren und Eindampfen i. Vak. nimmt man den Lack in Äther auf, saugt nach 12stdg. Aufbewahren bei 0°C von der evtl. ausgefallenen geringen Restmenge Dicyclohexylharnstoff ab und dampft das Filtrat i. Vak. ein. Ausb. 81.1 g (92%) H-Ser(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Leu-OMe · HCl (8–10)b (amorphes Pulver; $R_F = 0.77$ in Methyläthylketon/Pyridin/Wasser/Essigsäure 70:15:15:2, Dünnschichtfertigplatte Kieselgel F, Merck).

b) 52.6 g (170 mmol) öliges Z-Thr(Bu^t)-OH³¹⁾ und 22.3 g (165 mmol) HOBt werden in 250 ml DMF bei 0°C mit 34.1 g (165 mmol) DCCI versetzt. Nach 2stdg. Rühren bei Raumtemp. saugt man vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab und wäscht mit 250 ml DMF. In das Filtrat trägt man 79.06 g (155 mmol) H-Ser(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Leu-OMe · HCl (8–10)b ein und gibt nach Abkühlen auf 0°C 19.7 ml (155 mmol) *N*-Äthylmorpholin zu. Nach 18stdg. Rühren bei Raumtemp. dampft man i. Hochvak. ein, nimmt den festen Rückstand in Essigester auf, filtriert vom restlichen Dicyclohexylharnstoff und wäscht das Essigesterfiltrat mit KHSO_4 -, NaHCO_3 - und NaCl-Lösung. Die über Na_2SO_4 getrocknete Essigesterlösung dampft man i. Vak. ein und verreibt den festen Rückstand zweimal mit Diisopropyläther/Petroläther 4:1. Ausb. 105.4 g (89%), Schmp. 180°C, $[\alpha]_D^{25} = -10.3^\circ$ ($c = 2$, in Methanol).

$\text{C}_{39}\text{H}_{64}\text{N}_4\text{O}_{11}$ (765.0) Ber. C 61.24 H 8.43 N 7.32 Gef. C 61.2 H 8.5 N 7.1

Z-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Leu-OH (7–10)b: Zu 31.24 g (40.8 mmol) Z-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Leu-OMe (7–10)a in 400 ml Dioxan und 50 ml Methanol werden im Verlauf von 20 min 44 ml 1 N NaOH getropft. Nach 30 min Nachrühren bringt man mit KHSO_4 -Lösung auf pH 5, engt i. Vak. ein, versetzt mit Wasser, säuert mit KHSO_4 -Lösung an und extrahiert mit Essigester. Der mit Wasser gewaschene Essigesterextrakt wird über

³¹⁾ E. Schröder, Liebigs Ann. Chem. 670, 127 (1963).

Na₂SO₄ getrocknet, i. Vak. auf ein kleines Volumen eingedampft und mit Petroläther versetzt. Nach 24stdg. Stehenlassen saugt man den Niederschlag ab und wäscht mit Petroläther. Ausb. 26.82 g (88%), $[\alpha]_D^{25} = -6.4^\circ$ ($c = 1$, in Methanol). Nach dem Dünnschichtchromatogramm enthält das Produkt noch eine geringe Menge an Ester (7--10)a.

C₃₈H₆₂N₄O₁₁ (750.95) Ber. C 60.77 H 8.32 N 7.46 Gef. C 60.9 H 8.5 N 7.5

Z-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Leu-Ser(Bu^t)-Arg-Leu-OH (7-13): Die Lösung von 12.01 g (16 mmol) *Z-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Leu-OH (7-10)b* und 2.45 g (15 mmol) HOObt in 65 ml DMF wird bei 0°C mit 3.10 g (15 mmol) DCCI versetzt. Nach 1stdg. Rühren bei 0°C und 1stdg. Rühren bei Raumtemp. saugt man vom Dicyclohexylharnstoff ab und trägt in das Filtrat 6.86 g (15 mmol) *H-Ser(Bu^t)-Arg-Leu-OH (11-13)c* ein. Beim Rühren bei Raumtemp. erstarrt der Kolbeninhalt nach kurzer Zeit. Man verdünnt mit 160 ml DMF, rührt 12 h und versetzt die dünne Gallerte mit KHSO₄-Lösung. Nach Verreiben saugt man den Niederschlag ab, wäscht mit Wasser und verreibt erneut mit KHSO₄-Lösung. Das abgesaugte und mit Wasser neutral gewaschene Produkt wird nach Trocknen mit Methanol ausgekocht und schließlich mit NaHCO₃-Lösung und Wasser verrieben. Ausb. 12.6 g (72%). Schmp. 236°C (Zers.), $[\alpha]_D^{25} = -24.2^\circ$ ($c = 1$, in 90proz. Essigsäure).

C₅₇H₉₈N₁₀O₁₅ (1163.5) Ber. N 12.04 Gef. N 12.0

Aminosäureanalyse:

Ber. Thr 1	Ser 2	Glu 1	Leu 2	Arg 1
Gef. Thr 0.88	Ser 1.93	Glu 0.98	Leu 2.00	Arg 0.98

Teilsequenz 1-6

Z-Gly-Thr(Bu^t)-Phe-OMe (4-6)a: Zur Lösung von 79.5 g (0.38 mol) *Z-Gly-OH*³², 51.3 g (0.38 mol) HOBT und 141 g (0.38 mol) *H-Thr(Bu^t)-Phe-OMe · HCl*³³ in 900 ml DMF gibt man bei -10°C 48.6 ml *N*-Äthylmorpholin und anschließend die Lösung von 85 g (0.41 mol) DCCI in 60 ml DMF. Nach 12stdg. Rühren bei 5°C saugt man vom Dicyclohexylharnstoff ab, dampft das Filtrat i. Hochvak. ein, nimmt den öligen Rückstand in Essigester auf, wäscht die Essigester-Lösung mit KHSO₄- und NaHCO₃-Lösung sowie mit Wasser, trocknet über MgSO₄ und engt i. Vak. ein. Das erhaltene Öl kristallisiert aus Äther/Petroläther. Ausb. 181.0 g (90%), Schmp. 84°C, $[\alpha]_D^{25} = +27.8^\circ$ ($c = 1$, in DMF).

C₂₈H₃₇N₃O₇ (527.6) Ber. C 63.71 H 7.06 N 7.99 Gef. C 63.5 H 7.3 N 8.0

Z-Gly-Thr(Bu^t)-Phe-OH (4-6)b: 47.5 g (90 mmol) *Z-Gly-Thr(Bu^t)-Phe-OMe (4-6)a* werden in 300 ml Dioxan/Wasser (2:1) unter Zusatz von wenig Methanol bei pH 11 mit 1 N NaOH verseift. Nach Neutralisieren mit verd. Salzsäure destilliert man i. Vak. die organischen Lösungsmittel ab, verdünnt mit 125 ml Wasser und säuert mit verd. Salzsäure auf pH 3.5 an. Das ausgefallene Produkt wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Ausb. 43.5 g (94%), Schmp. 80°C, $[\alpha]_D^{25} = +43.6^\circ$ ($c = 1$, in Methanol).

C₂₇H₃₅N₃O₇ (513.6) Ber. C 63.14 H 6.86 N 8.18 Gef. C 62.8 H 6.6 N 8.0

Boc-His-Ser(Bu^t)-Asp(OBu^t)-Gly-Thr(Bu^t)-Phe-OH (1-6): Man löst bei 0°C unter Rühren 5.65 g (21 mmol) *Boc-His-N₂H₃*³⁴ in 84 ml 1 N HCl und gibt 4.85 ml 5 N NaNO₂-Lösung hinzu. Nach 5 min Rühren bei 0°C fügt man 150 ml vorgekühlten Essigester zu, stellt die Mischung mit eiskalter gesätt. Natriumcarbonat-Lösung auf pH 9, trennt die Essigesterphase ab, extrahiert die wäbr. Phase nochmals mit kaltem Essigester und trocknet

³²) M. Bergmann und L. Zervas, Ber. Deut. Chem. Ges. **65**, 1192 (1932); F. D. DeTar, R. Silverstein und F. F. Rogers, J. Amer. Chem. Soc. **88**, 1024 (1966).

³³) E. Wünsch, A. Zwick und E. Jaeger, Chem. Ber. **101**, 336 (1968).

³⁴) E. Schröder und H. Gibian, Liebigs Ann. Chem. **656**, 190 (1962).

die vereinigten Essigesterextrakte kurz bei 0°C über MgSO₄. Die bei 0°C Badtemp. bis auf wenige ml eingeeengte Essigesterlösung wird dann mit 12 ml vorgekühltem DMF in die ebenfalls auf 0°C abgekühlte Lösung von 5.1 g (7 mmol) H-Ser(Bu^t)-Asp(OBu^t)-Gly-Thr(Bu^t)-Phe-OH (2-6)¹⁴) in 70 ml DMF gespült. Das Reaktionsgemisch wird 5 h bei 0°C gerührt und 12 h bei 4°C stehengelassen. Der nach Eindampfen i. Hochvak. erhaltene farblose Festkörper wird aus Äthanol/Äther umgefällt und anschließend aus Äthanol/Aceton und Methanol/Wasser umkristallisiert. Aus den eingedampften Mutterlaugen gewinnt man durch 36stufige Gegenstromverteilung im System n-Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) 30% der Gesamtausb. als Reinsubstanz. Ausb. 3.96 g (60%), Schmp. 180°C (Zers.), $[\alpha]_D^{25} = -9.7^\circ$ ($c = 1$, in DMF).

C₄₅H₇₀N₈O₁₃ · H₂O (944.1) Ber. C 57.02 H 7.65 N 11.81 Gef. C 57.0 H 7.5 N 11.8

Aminosäureanalyse:

Ber. His	1	Ser	1	Asp	1	Gly	1	Thr	1	Phe	1
Gef. His	1.04	Ser	0.78	Asp	1.08	Gly	1.00	Thr	0.89	Phe	1.00

Aufbau der Gesamtsequenz

Z-Arg(Z₂)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂ (18-27): Die Lösung von 38.5 g (47 mmol) *Z-Arg(Z₂)-Leu-Gln-OH*¹¹) und 7.66 g (47 mmol) HOObt in 1.4 Liter DMF versetzt man bei 0°C mit 9.70 g (47 mmol) DCCI und rührt 1 h bei 0°C und 2 h bei Raumtemp. Dann kühlt man wieder auf 0°C ab und gibt 45.1 g (47 mmol) *H-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂ · HBr*¹¹) sowie 6.02 ml (47 mmol) *N*-Äthylmorpholin zu. Nach 26stdg. Rühren bei Raumtemp. gießt man die Suspension in 13.5 Liter Äther, läßt unter gelegentlichem Umrühren 48 h stehen, saugt dann den fest gewordenen Niederschlag ab, wäscht ihn mit Äther, verreibt ihn im Mörser mit Wasser, saugt ab und wäscht mit Wasser. Das getrocknete Rohprodukt wird zweimal mit je 800 ml Methanol ausgekocht. Ausb. 61.2 g (78%), $[\alpha]_D^{25} = -35.0^\circ$ ($c = 1$, in 80proz. Essigsäure) (Lit.¹¹) -35.2° .

Z-Arg(Z₂)-Asp(OBu^t)-Ser(Bu^t)-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂ (14-27): Zur auf 0°C abgekühlten Lösung von 13.75 g (14.3 mmol) *Z-Arg(Z₂)-Asp(OBu^t)-Ser(Bu^t)-Ala-OH*¹²) und 2.33 g (14.3 mmol) HOObt in 250 ml DMF gibt man 2.95 g (14.3 mmol) DCCI. Nach 1 $\frac{1}{2}$ stdg. Rühren bei 0°C und 1 $\frac{1}{2}$ stdg. Rühren bei Raumtemp. trägt man 18.92 g (13.0 mmol) *H-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂ · HBr*¹¹) ein und versetzt nach Abkühlen auf 0°C mit 1.67 ml (13.0 mmol) *N*-Äthylmorpholin. Man rührt 24 h bei Raumtemp., gießt dann in 2.35 Liter heißen Essigester, saugt heiß ab und wäscht mit heißem Essigester. Das trocken gesaugte Produkt wird in 1 Liter Wasser 2 h verrührt, nach 12stdg. Stehenlassen bei 0°C abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Ausb. 26.4 g (88%), $[\alpha]_D^{25} = -30.1^\circ$ ($c = 1$, in 80proz. Essigsäure) (Lit.¹²) -31.0° .

Z-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Leu-Ser(Bu^t)-Arg(HBr)-Leu-Arg(HBr)-Asp(OBu^t)-Ser(Bu^t)-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂ (7-27) a: Die Lösung von 8.97 g (7.7 mmol) *Z-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Leu-Ser(Bu^t)-Arg-Leu-OH* (7-13), 1.23 g (7.7 mmol) Pyridin-hydrobromid und 1.04 g (7.7 mmol) HOBT in 200 ml DMF wird nach 15 min Rühren mit 13.86 g (7.0 mmol) *H-Arg(HBr)-Asp(OBu^t)-Ser(Bu^t)-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂ · HBr*¹²) versetzt. Man verdünnt mit 100 ml DMF und gibt bei 0°C 1.59 g (7.7 mmol) DCCI hinzu. Nach 1stdg. Rühren bei 0°C verdünnt man die Gallerte nochmals mit 100 ml DMF und rührt 48 h bei Raumtemp. Dann versetzt man mit 4 Liter Essigester, saugt den Niederschlag nach 12stdg. Stehenlassen ab, wäscht mit Essigester, kocht mit Essigester aus und wäscht mit heißem Essigester. Ausb. 17.57 g (76%), $[\alpha]_D^{25} = -26.6^\circ$ ($c = 1$, in 80proz. Essigsäure) (Lit.¹⁵) -22.1° .

H-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Leu-Ser(Bu^t)-Arg(HBr)-Leu-Arg(HBr)-Asp(OBu^t)-Ser(Bu^t)-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂·HBr(7-27)a werden unter gelindem Erwärmen in 2.0 Liter Methanol und 0.5 Liter Dimethylacetamid gelöst. Man hydriert 10 h in Gegenwart von Palladium/BaSO₄, engt nach Entfernung des Katalysators i. Vak. auf 800 ml ein, gibt 1.01 g (6.3 mmol) Pyridin-hydrobromid und anschließend 4.7 Liter Essigester zu, saugt den Niederschlag ab und wäscht mit Essigester. Ausb. 12.44 g (73%), $[\alpha]_D^{25} = -30.2^\circ$ ($c = 1$, in 80proz. Essigsäure) (Lit.¹⁵) -26.8° bzw. -28.2°).

Boc-His-Ser(Bu^t)-Asp(OBu^t)-Gly-Thr(Bu^t)-Phe-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Leu-Ser(Bu^t)-Arg(HBr)-Leu-Arg(HBr)-Asp(OBu^t)-Ser(Bu^t)-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂(1-27): 1.06 g (1.12 mmol) Boc-His-Ser(Bu^t)-Asp(OBu^t)-Gly-Thr(Bu^t)-Phe-OH (1-6), 0.15 g (1.12 mmol) HOBT und 3.48 g (1.08 mmol) H-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Leu-Ser(Bu^t)-Arg(HBr)-Leu-Arg(HBr)-Asp(OBu^t)-Ser(Bu^t)-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂·HBr·4H₂O (7-27)b in 100 ml DMF werden bei 0°C mit 0.23 g (1.12 mmol) DCCI und 0.14 ml (1.08 mmol) *N*-Äthylmorpholin versetzt. Man rührt 1 h bei 0°C und 36 h bei Raumtemp., gibt Essigester zu, saugt den Niederschlag nach 3stdg. Stehenlassen ab, wäscht mit Essigester, verreibt nach Trocknen mit Wasser/Methanol (3:1) und zentrifugiert. Ausb. 3.40 g (76%).

Sekretin

3.00 g (1-27) werden in 60 ml Trifluoressigsäure gelöst. Nach 1 stdg. Rühren bei Raumtemp. engt man i. Vak. schonend ein, verreibt den öligen Rückstand mit absol. Äther, saugt das entstandene Festprodukt ab, wäscht mit absol. Äther und trocknet über KOH und P₂O₅ i. Hochvak. Das Pulver (2.82 g) löst man in 35 ml Wasser, gibt die Lösung auf eine mit Amberlite IR-45 (Acetat-Form) gefüllte Säule (Länge 44 cm, Durchmesser 3 cm) und eluiert mit Wasser in Fraktionen à 20 ml. Die Fraktionen 9-18 bringt man sofort auf eine mit SP-Sephadex C-25 gefüllte Säule von 33 cm Länge und 8 cm Durchmesser und eluiert nacheinander mit NH₄HCO₃-Puffern vom pH 6.5, 6.7 und 6.9 analog nach der Vorschrift von *Wünsch*¹⁶). Es wird in Fraktionen zu je 300 Tropfen aufgefangen; pro Fraktion werden 2 ml einer 1.5proz. Cystein-hydrochlorid-Lösung vorgelegt. Nach Verdünnen auf das 3-4fache Volumen mit Wasser werden z. B. die Fraktionen 170-205, 206-245, 246-285 und 286-300 gefriergetrocknet.

Ausbeute:

Fraktion	Gesamtmenge	Gehalt an Peptid-Base	Menge an reiner Sekretinbase
170-205	3.07 g	4.5%	(45 mg)
206-245	3.84 g	7.6%	294 mg
246-285	2.97 g	6.0%	178 mg
286-300	2.10 g	5.1%	(35 mg)

Das chromatographisch reine Produkt der Fraktionen 206-285 zeigt eine biolog. Aktivität von 3800-4000 klin. E./mg und das der Fraktionen 170-205 und 286-300 eine Aktivität von 1200-1300 klin. E./mg, jeweils bezogen auf Peptid-Base. Aus der weniger aktiven Substanz läßt sich durch Wiederholen der Säulentrennung an SP-Sephadex ebenfalls hochaktives Sekretin gewinnen.

Aminosäureanalyse von Sekretin aus Frakt. 206-285:

	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Leu	Phe	His	Arg
Ber.	2	2	4	3	2	1	1	6	1	1	4
Gef.	2.02	1.73	3.46	2.91	2.02	1.00	1.03	6.08	0.95	0.92	4.00