

Zur Synthese von Human-Big-Gastrin I

5. Mitt.: Totalsynthese des sequenz-revidierten
Tetratriacontapeptidamids¹

Gerhard Wendberger*, **Liljana Mladenova-Orlinova^a**, **Walter Göhring**,
Regina Scharf und **Erich Wünsch**

Abteilung für Peptidchemie, Max-Planck-Institut für Biochemie,
D-8033 Martinsried bei München, Bundesrepublik Deutschland

(Eingegangen 8. April 1981. Angenommen 22. April 1981)

Synthesis of Human-Big-Gastrin I. Revised Primary Structure

The synthesis of the tetratriacontapeptide amide corresponding to the revised primary structure of human big gastrin I is described. For this purpose the fragments were designed in view of the maximum use of those utilized in our previous synthesis of human big gastrin I according to the first sequence proposal. Consequently the key tripeptide -Pro-Pro-His- (sequence 7-9) was prepared in suitably protected form to be used as amino or carboxyl component for assembly of the segments 1-9 and 1-14, respectively. Final condensation of the latter nona- and tetradecapeptide derivatives with the C-terminal segments 10-34 and 15-34 via the azide and the dicyclohexylcarbodiimide/*N*-hydroxy-succinimide procedure, respectively, leads to crude fully protected human big gastrin I. Upon deprotection by exposure to trifluoroacetic acid in presence of ethanedithiol-(1,2) as scavenger, ion exchange chromatography and partition chromatography, the desired tetratriacontapeptide amide was isolated in satisfactory yield with a high degree of purity. The identical immunological behaviour of the synthetic material, if compared with that of natural human big gastrin I, represents ulterior strong evidence for the correctness of the newly proposed structure for this putative prohormonal form of the gastrins.

(*Keywords: Gastrointestinal hormon, Human-Big-Gastrin I, revised structure; Synthetic peptide factors*)

Einleitung

In früheren Mitteilungen²⁻⁷ haben wir über die Synthese von Human-Big-Gastrin I gemäß dem Primär-Struktur-Vorschlag von

^a Gegenwärtige Adresse: Chemisch-Technologisches Institut der Universität Sofia, Bulgarien.

Harris, Kenner und *Gregory*⁸ und seinem 32-Leucin-Analogen berichtet. Das erhaltene synthetische Tetratriacontapeptid hatte im Vergleich mit dem natürlichen Hormon dieselbe biologische Aktivität (Stimulierung der Magensekretion^{9,10}) und eine analoge Bindungsaffinität gegenüber Antikörpern, die mit Hilfe des Naturstoffs gewonnen wurden und gegen dessen C-terminalen Bereich gerichtet sind^{9,11}. Dagegen besaß eine Naturstoff-Antiserum-Preparation mit einer Spezifität gegenüber dem N-terminalen Bereich 1—17 kaum ein signifikantes Bindungsvermögen für das synthetische Material⁹. Dieses letzte Ergebnis deutete nachdrücklich auf einen Fehler der Sequenzermittlung im N-terminalen Bereich hin. Die Wiederholung der Strukturermittlung sowohl an Schweine- als auch Human-Big-Gastrin, die Auffindung der Nucleotid-Sequenz von ersterem und vergleichende immunologische Studien mit synthetischen Partialsequenzen des N-terminalen Bereichs ließen es letztlich Gewißheit werden, daß die Sequenzpositionen 7—9 für beide Gastrin-Wirkstoffe -Pro-Pro-His-lauten müssen und nicht -His-Pro-Pro- bzw. -His-Pro-Ser-⁹⁻¹³.

Ergebnisse und Diskussion*

Auf der Grundlage unserer bisherigen Human-Big-Gastrin-Synthese³ haben wir die künstliche Darstellung des Tetratriacontapeptids (mit der revidierten Struktur) auf zwei Wegen beschritten, wobei als Schlüsselsubstanz *Z*-Pro-Pro-His-NHNH (*Boc*) diene.

Erstellung der „Schlüsselsubstanz“ Teilsequenz 7—9

Das Tripeptid-Derivat konnte aus *Z*-Pro-Pro-OH¹⁴ [7—8] — leicht zugänglich aus den Komponenten *Z*-Pro-OH und H-Pro-OMe nach der *Goldschmidtschen* Phosphorazomethode¹⁵ und Verseifung des Acyldipeptidesters — und H-His-NHNH(*Boc*)¹⁶ [9] nach dem Alkylkohlen säure-Mischanhydrid-Verfahren¹⁷⁻¹⁹ gewonnen werden. Das amorph anfallende Material wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel 60 (Merck) gereinigt; *Z*-Pro-Pro-His-NHNH(*Boc*) [7—9 a] als Monoacetat isoliert.

* *Abkürzungen*: Es werden hier die von der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature empfohlenen Abkürzungen für Aminosäuren und Schutzgruppen verwendet.

Andere Abkürzungen: *DCCD* = N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid; *HONSu* = N-Hydroxysuccinimid; *TFE* = Trifluoressigsäure; *MA* = Mischanhydrid-Methode; *HG-34* = Human-Big-Gastrin I; *PG-34* = Schweine-Big-Gastrin I.

Weg a: Erstellung der Teilsequenzen 1—9 (Großfragment II) und 10—34 (Großfragment I)

Teilsequenz 1—9

Z-Pro-Pro-His-NHNH(*Boc*) [7—9 a] wurde hydrogenolytisch entacyliert; das resultierende H-Pro-Pro-His-NHNH(*Boc*) [7—9 b], isoliert als Diacetat, ließ sich ohne Schwierigkeit mit <Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-OH⁵ [1—6] nach dem Hydroxysuccinimidester-Verfahren zum Nonapeptid-(*tert*-butyloxycarbonyl)-hydrazid [1—9 a] umsetzen. Das erhaltene Rohprodukt konnte durch Säulenchromatographie an Kieselgel 60 (Merck) von nicht umgesetztem Ausgangsmaterial und geringen Mengen Nebenprodukten befreit werden. Das chromatographisch reine Material wurde ohne Charakterisierung zur Entfernung des *tert*-Butyloxycarbonyl-Restes mit Trifluoressigsäure behandelt, das isolierte <Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Pro-His-NHNH₂ [1—9 b] einer säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel 60 (Merck) unterworfen und als Peptidhydrazid-monoacetat charakterisiert.

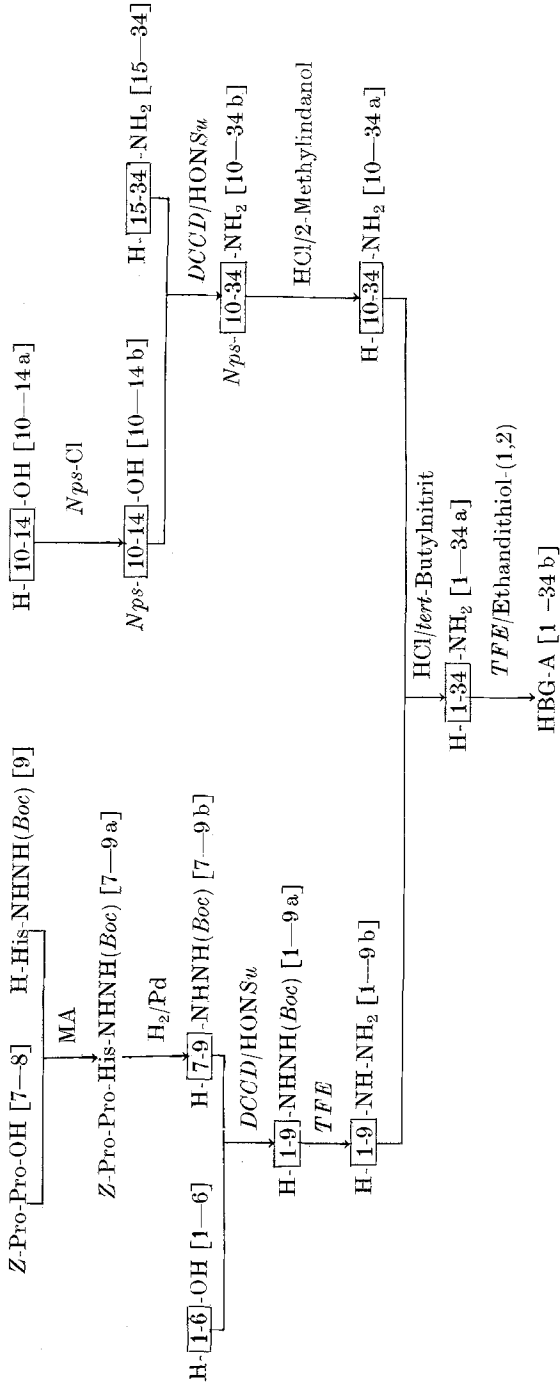
Teilsequenz 10—34

Startmaterial zur Erstellung dieser Teilsequenz (Großfragment I) bildete das Eicosapeptidamid-Derivat H-Ser(*But*^t)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Ala-Tyr(*But*^t)-Gly-Trp-Met-Asp(*OBu*^t)-Phe-NH₂ [15—34], ein Zwischenfragment unserer ersten Human-Big-Gastrin-Synthese⁶; an dieses wurde das Fragment *Nps*-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu*^t)-Pro-OH [10—14 b] nach dem Carbodiimid-Hydroxysuccinimid-Verfahren^{20,21} angefügt. Das in 80% Ausbeute anfallende *Nps*-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu*^t)-Pro-Ser(*But*^t)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Glu(*OBu*^t)-Ala-Tyr(*But*^t)-Gly-Trp-Met-Asp(*OBu*^t)-Phe-NH₂ [10—34 a] konnte in Trifluorethanol wie üblich mit methanolischem Chlorwasserstoff unter Zugabe von 20 Äquivalenten Methylinol zum „aminofreien“ seitenkettengeschützten Pentacosapeptidamid [10—34 b] entacyliert werden (isoliert in Form des Hydrochlorids in fast quantitativer Ausbeute). Die für die Synthese des Großfragments 10—34 erforderliche Teilsequenz *Nps*-[10—14]-OH war leicht durch Nitrophenylsulfenylierung des freien Pentapeptid-Derivats [10—14 a] zugänglich, letzteres wiederum ein Zwischenprodukt unserer ersten Human-Big-Gastrin-Synthese⁵.

Weg b: Erstellung der Teilsequenz 1—14 (Großfragment III)

Die Schlüsselsubstanz Z-Pro-Pro-His-NHNH(*Boc*) [7—8 a] wurde zur Abspaltung des *tert*-Butyloxycarbonyl-Restes mit Trifluoressig-

Schema 1 (Weg a.)

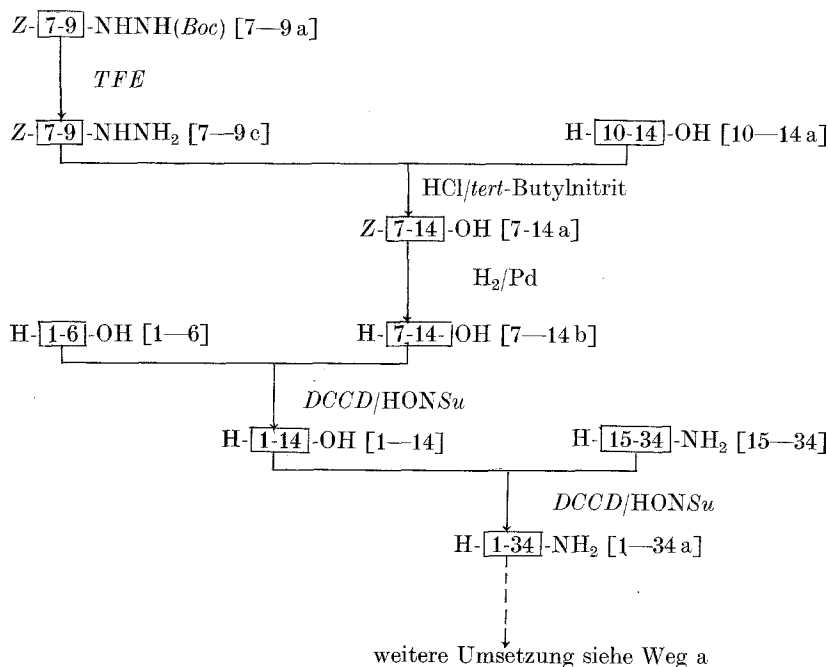


säure behandelt; das resultierende *Z*-Pro-Pro-His-NHNH₂ [7—9 c], isoliert als Sesquitrifluoracetat, ließ sich nach der *Rudinger-Honzl*-Azidmethode²² mit dem Pentapeptid-Derivat H-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu*^{*t*})-Pro-OH⁴ [10—14 a] in hoher Ausbeute zum Octapeptid-Derivat *Z*-Pro-Pro-His-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu*^{*t*})-Pro-OH [7—14 a] verknüpfen. Anschließend Entfernung des Benzyloxycarbonyl-Restes — unter Einhaltung eines *pH*-Wertes von 4—4,5 durch Zutropfen von methanolischem Chlorwasserstoff — erbrachte in 95% Ausbeute H-Pro-Pro-His-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu*^{*t*})-Pro-OH [7—14 b], isoliert als Dihydrochlorid.

An diese Octapeptid-Teilsequenz wurde das Fragment <Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-OH [1—6] nach dem Hydroxysuccinimidester-Verfahren (ohne Charakterisierung des Aktivesters) angebaut: <Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Pro-His-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu*^{*t*})-Pro-OH [1—14] konnte nach Säulenchromatographie an Kieselgel 60 (Merck) in Form des Tetrahydrats in hoher Reinheit und Ausbeute gewonnen werden.

Als Verknüpfungskomponente wurde das aus der ersten Human-Big-Gastrin-Synthese bekannte Hauptfragment 15—34⁵ herangezogen.

Schema 2 (Weg b)



Erstellung der Gesamtsequenzen 1—34

Die Verknüpfung der Großfragmente < Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Pro-His-NHNH₂ [1—9 b] (Fragment II) und H-Leu-Val-Ala-Asp(OBu^t)-Pro-Ser(Bu^t)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-Trp-Met-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ [10—34 b] (Fragment I) nach dem *Rudinger-Honzl*-Azidverfahren²¹ einerseits (Weg a) sowie des Großfragments < Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Pro-His-Leu-Val-Ala-Asp(OBu^t)-Pro-OH [1—14] (Fragment III) mit H-Ser(Bu^t)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-Trp-Met-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂⁵ [15—34] (Fragment IV) nach dem *Wünsch-Weygand*-Verfahren^{19,20} andererseits (Weg b), erbrachten jeweils die Tetratriacontapeptidamid-Derivat-Rohprodukte [1—34 a], die sich von begleitenden Ausgangsmaterialien und Nebenprodukten auch unter großen Verlusten nicht trennen ließen.

Beide Rohprodukte wurden deshalb ohne weitere Reinigung der üblichen Schutzgruppenabspaltung mit Trifluoressigsäure zugeführt.

Reindarstellung des synthetischen Human-Big-Gastrins I

Die nach den zwei Syntheserouten erhaltenen, allseits geschützten Tetratriacontapeptidamid-Derivate [1—34 a] wurden durch Einwirkung von wasserfreier Trifluoressigsäure in Gegenwart von Ethandithiol-(1,2) und Anisol unter Argonatmosphäre von allen Schutzgruppen befreit. Die isolierten, rohen Peptidamide HBG-A, d. s. < Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Pro-His-Leu-Val-Ala-Asp-Pro-Ser-Lys-Lys-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ [1—34 b] wurden jeweils getrennt zunächst zur Entfernung der Trifluoacetat-Ionen und zur Vorreinigung einer Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex A-25 unterworfen. Hierbei konnten von dem „Weg a-Produkt“ ein Anteil Pentacosapeptidamids aus nicht umgesetztem H-[10—34]-NH₂ [10—34 b] (Abb. 1), von dem „Weg b-Produkt“ eine relativ große Menge Eicosapeptidamids aus nicht umgesetztem H-[15—34]-NH₂ [15—34] abgetrennt werden. Durch anschließende Verteilungschromatographie an Sephadex G-25 ließen sich die erhaltenen Hauptprodukte der Ionenaustauschchromatographie (HBG-B) vom begleitenden Methionin-S-oxid-Derivat und einigen anderen nicht näher charakterisierten Verunreinigungen befreien (Abb. 2). Dennoch erwiesen sich die isolierten Hauptfraktionen HBG-C (beider Wege a und b) im dünnschichtchromatographischen Test nicht einheitlich; sie wurden einer Ionenaustauschchromatographie, diesmal

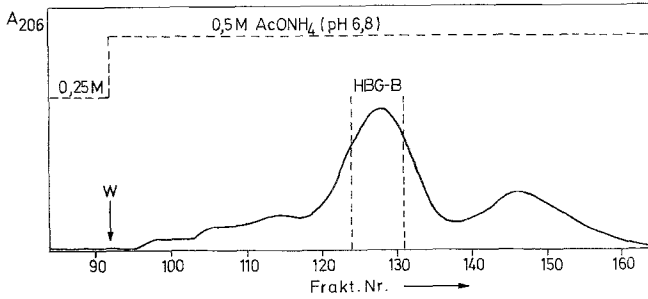


Abb. 1. Ionenaustauschchromatographie von rohem, synthetischem Human-Big-Gastrin I (HBG-A, Weg a-Produkt) an DEAE-Sephadex A-25

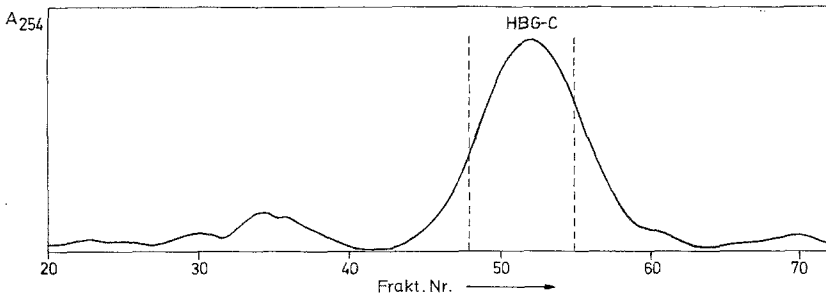


Abb. 2. Verteilungschromatographie von vorgereinigtem Human-Big-Gastrin I (HBG-B, Weg a-Produkt) an Sephadex G-25 im Zweiphasensystem Butanol-(2)/Ethanol/0,1 M Ammoniumacetat-Lösung (2,5:0,08:2); pH 6,2 in der Unterphase

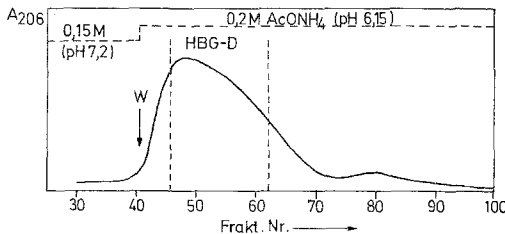


Abb. 3. Ionenaustauschchromatographie des nach Verteilungschromatographie erhaltenen Human-Big-Gastrins I (HBG-C, Weg a-Produkt) an DEAE-Cellulose 23-SH

an DEAE-Cellulose 23-SH zugeführt (Abb. 3). Dabei gelang vom HBG-D die Abtrennung u. a. eines Nebenproduktes, dessen Aminosäurezusammensetzung für ein Peptid mit den Aminosäurebausteinen der Gesamtsequenz bei Verdopplung der Positionswerte 10—14 spricht.

(Ob es sich hierbei um ein N^G -Peptidyl-Derivat handelt, das aus einer Kondensation der Fragmente 10—14 und 15—34 hervorgegangen ist, konnte noch nicht geklärt werden.) Die synthetischen Tetratriacontapeptide HBG-D [1—34 b] — erhalten nach obigen Reinigungsoperationen aus den Rohprodukten nach Weg a und b — waren chromato-

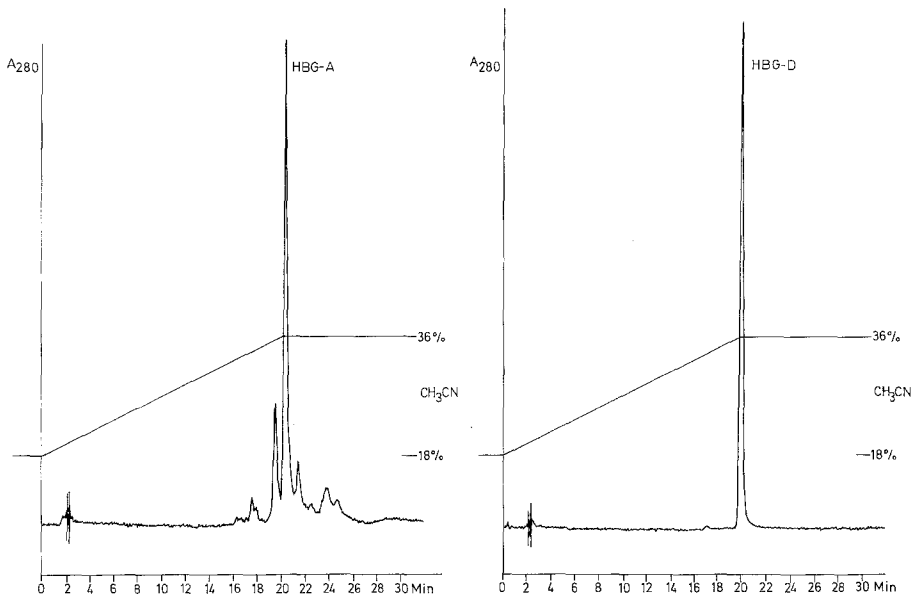


Abb. 4. Hochdruckflüssigkeitschromatographie an μ -Bondapak C 18-Säule. Elution: Linearer Gradient (20 min): 18—36% Acetonitril/0,1 M Ammoniumacetat (pH 4,0); Durchflußgeschwindigkeit: 1,7 ml/min. Rohprodukt HBG-A (Weg a-Produkt) und gereinigtes, synthetisches HBG-D

graphisch nach der Dünnschicht- und Hochdruckflüssigkeitsmethode einheitlich (Abb. 4); sie enthielten (Tab. 1) jeweils eine geringe Menge des Methionin-S-oxid-Derivats, möglicherweise gebildet durch „laufende Nachoxidation“ im Verlauf der durchgeführten Reinigungsoperationen. Das „synthetische Human-Big-Gastrin“ besaß die übliche biologische Aktivität und nunmehr auch die gleiche Affinität gegenüber Antikörpern des Schweine-Big-Gastrins (PG-34), spezifisch gerichtet gegen das N-terminale Ende (als Antiserum L 33 bezeichnet) im Vergleich zum menschlichen Wirkstoff (HG-34 vgl. Lit.¹).

Tabelle 1. Aminosäureanalyse von synthetischem Human-Big-Gastrin I HBG-D mit revidierter Sequenz. a) nach saurer Hydrolyse mit 6N-HCl (24 h; 110°C) unter Zusatz von Thioglykolsäure (2,5%) b) nach enzymatischer Hydrolyse mit Aminopeptidase M* (Fa. Boehringer, Mannheim, Kat.-Nr. 102 768; Kontr.-Nr. 1 248 215)

	a)	b)
Lys	1,96	2,05
His	0,94	0,92
Trp	2,00	2,04
Asp	1,97	2,00
Ser	1,00	1,00
Glu	7,83	5,08*
Gln	—	1,98
Pro	5,05	5,16
Gly	3,86	3,99
Ala	1,88	1,84
Val	1,03	1,09
Met	0,97	0,95
Leu	2,96	2,00*
Tyr	1,00	1,05
Phe	1,01	1,01
Met-S-oxid	—	0,03

* Die enzymatische Hydrolyse mit der verwendeten Enzym-Charge wird durch Abspaltung des Dipeptids <Glu-Leu-OH eingeleitet; 1 Glu und Leu werden deshalb bei der Aminosäureanalyse nicht erfaßt; vgl. Lit.⁷.

Dank

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die großzügige Gewährung der Mittel für den Gastaufenthalt von Frau Dr. *L. Mladenova-Orlinova* (vom Chemisch-Technologischen Institut der Universität in Sofia, Bulgarien).

Herrn Prof. Dr. *A. Gregory* und Dr. *G. J. Dockray* (Physiological Laboratory, University of Liverpool, Brownlow Hill, Liverpool L69 3BX, England) danken wir für die Durchführung der immunologischen Untersuchungen.

Fräulein *E. Weyher* danken wir für die Bestimmung der Aminosäure-Werte, Frau *M. Mattern* für die Ausführung der Elementar-Analysen (Analytische Laboratorien der Abteilung).

Experimenteller Teil

Die Schmelzpunktbestimmung erfolgte in offenen Kapillaren im Apparat nach Dr. *Tottoli*. Die Drehwerte wurden im lichtelektrischen Polarimeter von Perkin-Elmer, Modell 241 MC, ermittelt. Die Reinheit von Zwischen- und Endprodukten wurde mittels Dünnschichtchromatographie auf DC- oder

HPTLC-Fertigplatten, Kieselgel 60 der Fa. E. Merck, Darmstadt, bzw. durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) überprüft. Für die HPLC diente ein Gerät der Fa. Waters (Königstein/Ts.), bestehend aus Steuergerät Modell 660, Einspritzblock U6K, 2 Pumpen Modell 6000 A und UV-Spektralphotometer Modell 450. Die Aminosäureanalysen wurden nach saurer Hydrolyse mit 6*N*-HCl unter Thioglykolsäure-Zusatz für tryptophanhaltige Peptide am „Amino Acid Analyzer“ der Fa. Beckman Instruments (Modelle 120 B bzw. Multichrom B) durchgeführt, die Elementaranalysen mittels des „Elemental Analyzer“ Perkin-Elmer Modell 240 bestimmt.

Die für die Säulenchromatographie erforderlichen Gelmaterialien Sephadex G-25, DEAE-Sephadex A-25 wurden von der Fa. Deutsche Pharmacia (Freiburg) bzw. DEAE-Cellulose 23-SH von der Fa. Serva (Heidelberg) bezogen. Die Ermittlung der Peptidverteilung in den Eluaten nach der Säulenchromatographie erfolgte durch kontinuierliche Absorptionsmessung mit Durchflußphotometern der Fa. LKB-Produkte (Stockholm), Modelle Uvicord I (254 nm) oder Uvicord III (206 nm). Zur Fraktionierung der Eluate wurde Fraktionssammler der Fa. Serva-Technik (Heidelberg), Modell Linear II, verwendet.

Erstellung der Teilsequenz 7—9

Benzoyloxycarbonyl-L-prolyl-L-prolyl-L-histidin-(tert-butyl-oxycarbonyl)-hydrazid-monoacetat [7—9 a]

Eine Lösung von 1,28 g *Z*-Pro-Pro-OH [7—8] in 20 ml *DMF/THF* (3:1) und 0,52 ml Triethylamin wird bei -15°C unter Rühren tropfenweise mit 0,35 ml Chlorameisensäureethylester versetzt. Nach 10 min fügt man zu dem Reaktionsgemisch eine auf -10°C gekühlte Lösung von 1 g *H*-His-NHNH(*Boc*) [9] in 20 ml *THF* und läßt weitere 6 h bei Raumtemp. rühren. Die nach Abfiltrieren des ausgeschiedenen Salzes erhaltene Lösung wird im Vak. eingedampft, der erhaltene Rückstand zwischen Essigester und 5proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung verteilt und die neutral gewaschene, über Natriumsulfat getrocknete Essigester-Phase im Vak. eingengt. Der durch Zugabe von Diisopropylether erhaltene Niederschlag wird an Kieselgel-60 (Merck; Korngröße 0,063—0,2 mm) mittels *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) säulenchromatographiert. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: $-66,5^{\circ}$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $-78,4^{\circ}$ ($c = 1$ in *DMF*). Ausb. 1,80 g (73,9% d. Th.).

$\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{N}_7\text{O}_7 \cdot \text{CH}_3\text{COOH}$ (657,7). Ber. C 56,61, H 6,58, N 14,91.
Gef. C 56,36, H 6,67, N 15,08.

Weg a: Erstellung der Großfragmente I und II

L-Prolyl-L-prolyl-L-histidin-(tert-butylloxycarbonyl)-hydrazid-diacetat [7—9 b · AcOH]

1,5 g *Z*-Pro-Pro-His-NHNH(*Boc*)·CH₃COOH [7—9 a] in 50 ml Essigsäure werden über Palladium katalytisch hydriert. Das Filtrat vom Katalysator wird im Vak. eingedampft und der erhaltene Rückstand mit Ether digeriert und abfiltriert. Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60:6:24:20). Ausb. 1,064 g (80% d. Th.).

$\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{N}_7\text{O}_5 \cdot 2\text{CH}_3\text{COOH}$ (583,6). Ber. C 51,44, H 7,08, N 16,80.
Gef. C 51,59, H 7,23, N 16,80.

L-2-Pyrrolidon-5-carboxyl-*L*-leucyl-glycyl-*L*-prolyl-*L*-glutaminyl-glycyl-*L*-prolyl-*L*-prolyl-*L*-histindinhydrazid-monoacetat-monohydrat [1—9 b · AcOH]

Zu einer Lösung von 0,794 g $\text{Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-OH} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [1—6] und 0,185 g HON $\text{S}u$ in 5 ml *DMF* gibt man bei 0°C 0,287 g *DCCD*. Nach 4 h Rühren bei Raumtemp. werden dem auf 0°C abgekühlten Reaktionsgemisch eine Lösung von 0,747 g $\text{H-Pro-Pro-His-NHNH(Boc)} \cdot 2\text{CH}_3\text{COOH}$ [7—9 b · AcOH] in 0,36 ml Triethylamin und 5 ml *DMF* zugefügt, und dann wird weitere drei Tage bei Raumtemp. gerührt. Nun wird das Lösungsmittel im Hochvak. abdestilliert und das nach Umfällen aus Methanol/Essigester erhaltene Rohprodukt [1—9 a] (= 1,3 g) einer Säulenchromatographie an Kieselgel 60 (Merck; Korngröße 0,063—0,2 mm) im Lösungsmittelsystem *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60:6:24:20) zugeführt. Der nach Abdestillieren des Elutionsmittels erhaltene Rückstand (1,25 g) wird mit 15 ml eiskalter Trifluoressigsäure übergossen und 1 h bei Raumtemp. aufbewahrt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Vak. wird das erhaltene Material (1,20 g) abermals an Kieselgel 60 (s. o.) säulenchromatographiert. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: $-91,4^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: -109° ($c = 0,5$ in Essigsäure). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1). Ausb. über beide Stufen 0,885 g (69,2% d. Th.).

$\text{C}_{41}\text{H}_{62}\text{N}_{14}\text{O}_{11} \cdot \text{CH}_3\text{COOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1005,1). Ber. C 51,38, H 6,82, N 19,51.
Gef. C 51,21, H 6,69, N 19,44.

Aminosäureanalyse:	Glu	Pro	Gly	Leu	His
Ber.	2	3	2	1	1
Gef.	2,00	2,90	2,00	1,02	0,89

2-Nitrophenylsulfenyl-*L*-leucyl-*L*-valyl-*L*-alanyl-*L*-asparagyl(β -*tert*-butylester)-*L*-prolin [10—14 b]

Zu einer Lösung von 0,648 g $\text{H-Leu-Val-Ala-Asp(OBu}^t\text{)-Pro-OH} \cdot \text{CH}_3\text{COOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ [10—14 a] in 50 ml *DMF* und 0,280 ml Triethylamin fügt man unter Rühren innerhalb 40 min 0,283 g 2-Nitrophenylsulfenylchlorid und 0,210 ml Triethylamin hinzu. Nach 12 h wird das Reaktionsgemisch im Hochvak. auf ein Volumen von 20 ml eingengt und dieses in überschüssige wäßrige Kaliumhydrogensulfat-Lösung eingerührt. Der gebildete Niederschlag wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen, mit Ether digeriert und getrocknet. Schmp. 142—145°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: $-58,1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: $-57,9^\circ$ ($c = 1$ in *DMF*). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1), *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60:6:24:20) und Chloroform/Trifluorethanol (3:1). Ausb. 0,699 g (96,8% d. Th.).

$\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{S}$ (722,8). Ber. C 54,83, H 6,97, N 11,62.
Gef. C 54,84, H 6,79, N 11,57.

2-Nitrophenylsulfenyl-*L*-leucyl-*L*-valyl-*L*-alanyl-*L*-asparagyl(β -*tert*-butylester)-*L*-prolyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-seryl-*N*^ε-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*N*^ε-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-tyrosyl-*L*-glutaminyl-glycyl-*L*-prolyl-*L*-tryptophyl-*L*-leucyl-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*L*-alanyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-tyrosyl-glycyl-*L*-tryptophyl-*L*-methionyl-*L*-asparagyl(β -*tert*-butylester)-*L*-phenylalaninamid-tetrahydrat [10—34 a]

1,62 g $\text{H-Ser(Bu}^t\text{)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu(OBu}^t\text{)-Glu(OBu}^t\text{)-Glu(OBu}^t\text{)-Glu(OBu}^t\text{)-Ala-Tyr(Bu}^t\text{)-Gly-Trp-Met-}$

Asp(O*Bu*^t)-Phe-NH₂·HCl·6H₂O [15—34·HCl], 1,08 g *Nps*-Leu-Val-Ala-Asp(O*Bu*^t)-Pro-OH [10—14 b], 0,07 ml Triethylamin und 0,230 g HON*Su* in 120 ml *DMF* werden bei 0°C mit 0,309 g *DCCD* versetzt und die Reaktionsmischung 15 h bei 4°C gerührt. Nach 3tägigem Rühren bei Raumtemp. wird das Lösungsmittel im Hochvak. entfernt, der Rückstand mit Wasser digeriert und abfiltriert. Der Filterkuchen wird aus Methanol/Wasser umgefällt, das erhaltene Produkt mit wenig Methanol digeriert. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: —15,8° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —16,20° ($c = 0,5$ in *DMF*). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60:6:24:20). Ausb. 1,55 g (80% d. Th.).

C₁₈₇H₂₈₄N₃₂O₄₈S₂·4H₂O (3884,7). Ber. C 57,82, H 7,57, N 11,54, S 1,65.
Gef. C 57,90, H 7,61, N 11,60, S 1,75.

L-Leucyl-*L*-valyl-*L*-alanyl-*L*-asparagyl(β-*tert*-butylester) - *L*-prolyl-0-*tert*-butyl-*L*-seryl-N^ε-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-N^ε-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*L*-glutaminyll-glycyl-*L*-prolyl-*L*-tryptophyl-*L*-leucyl-*L*-glutamyl(γ-*tert*-butylester) - *L*-glutamyl(γ-*tert*-butylester) - *L*-glutamyl(γ-*tert*-butylester) - *L*-glutamyl(γ-*tert*-butylester) - *L*-glutamyl(γ-*tert*-butylester) - *L*-alanyl-0-*tert*-butyl-*L*-tyrosyl-glycyl-*L*-tryptophyl-*L*-methionyl-*L*-asparagyl(β-*tert*-butylester) - *L*-phenylalaninamid-hydrochlorid-tetrahydrat [10—34 b·HCl]

Zu einer Lösung von 1,32 g *Nps*-Leu-Val-Ala-Asp(O*Bu*^t)-Pro-Ser(*Bu*^t)-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu(O*Bu*^t)-Glu(O*Bu*^t)-Glu(O*Bu*^t)-Glu(O*Bu*^t)-Ala-Tyr(*Bu*^t)-Gly-Trp-Met-Asp(*Bu*^t)-Phe-NH₂·4H₂O [10—34 a] und 0,891 g 2-Methylindol in 150 ml Trifluorethanol tropft man unter Rühren bei 0°C 0,408 ml 1*N* methanolischen Chlorwasserstoff. Nach 15 h Rühren bei Raumtemp. wird die Lösung im Vak. auf ein kleines Volumen eingedampft und mit Ether versetzt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert, mit Ether mehrmals gewaschen und getrocknet. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: —11,1° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —13,5° ($c = 1$ in *DMF*). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60:6:24:20). Ausb. 1,23 g (96% d. Th.).

C₁₈₁H₂₈₁N₃₁O₄₆S·HCl·4H₂O (3767,9).

Ber. C 57,69, H 7,76, N 11,52, S 0,85, Cl 0,94.

Gef. C 57,42, H 7,61, N 11,35, S 0,87, Cl 0,96.

		Aminosäureanalyse: Asp Ser Glu Pro Gly Ala						
		Ber. 2	1	6	2	2	2	
		Gef. 2,07	1,04	5,86	1,97	1,92	2,03	
		Val	Met	Leu	Tyr	Phe	Lys	Trp
Ber.	1	1	2	1	1	2	2	
Gef.	0,94	0,99	1,93	1,00	1,00	1,95	2,04.	

Weg b: Erstellung des Großfragments III

Benzoyloxycarbonyl-L-prolyl-*L*-prolyl-*L*-histidinhydrazid-sesquitrifluoracetat [7—9 c·TFE]

0,583 g *Z*-Pro-Pro-His-NHNH(*Boc*)·CH₃COOH [7—9 a] werden in 20 ml Trifluoressigsäure gelöst und 1 h bei Raumtemp. aufbewahrt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vak. abdestilliert, der ölige Rückstand durch Digerieren

mit Ether zur Kristallisation gebracht, der entstandene Niederschlag abfiltriert und über KOH bei 60 °C im Vak. getrocknet. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: —42,1° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —47,9° ($c=1$ in DMF). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1), *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60:6:24:20) und Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30). Ausb. 0,518 g (87,5% d. Th.).

$\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_7\text{O}_5 \cdot 1\frac{1}{2}\text{CF}_3\text{COOH}$ (668,6). Ber. C 48,50, H 4,89, N 14,66.
Gef. C 48,30, H 4,83, N 14,61.

Benzoyloxycarbonyl-L-prolyl-L-prolyl-L-histidyl-L-leucyl-L-valyl-L-alanyl-L-asparagyl(β -*tert*-butylester)-*L*-prolin [7—14 a]

1,20 g *Z*-Pro-Pro-His-NHNH₂ · 1½ CF₃COOH [7—9 c TFE], gelöst in 20 ml DMF und 0,89 ml 4*N* Chlorwasserstoff/Dioxan-Lösung, werden bei —2 °C mit 0,256 ml *tert*-Butylnitrit versetzt und 40 min bei —2 °C gerührt (Hydrazid-Test!). Dann neutralisiert man das Reaktionsgemisch bei —30 °C mit 0,875 ml Triethylamin und setzt bei 0 °C eine Lösung von 0,97 g H-Leu-Val-Ala-Asp(O*Bu*^{*t*})-Pro-OH · CH₃COOH · H₂O [10—14 a] in 30 ml DMF und 0,42 ml Triethylamin hinzu. Nach 12 h Rühren bei 0 °C und weiteren 12 h bei Raumtemp. wird das Lösungsmittel im Vak. abdestilliert und der Rückstand zwischen *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (7:1:2) verteilt. Die Butanol-Phase wird mit Wasser gewaschen, im Vak. eingedampft und das erhaltene Material zweimal aus Methanol/Essigester umgefällt. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: —72,3° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —86,8° ($c=1$ in DMF). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (6:3:4) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Essigester (3:1:1:5). Ausb. 1,29 g (90% d. Th.).

$\text{C}_{51}\text{H}_{74}\text{N}_{10}\text{O}_{13}$ (1035,2). Ber. C 59,17, H 7,20, N 13,53.
Gef. C 58,96, H 7,24, N 13,31.

L-Prolyl-*L*-prolyl-*L*-histidyl-*L*-leucyl-*L*-valyl-*L*-alanyl-*L*-asparagyl(β -*tert*-butylester)-*L*-prolin-dihydrochlorid-pentahydrat [7—14 b · HCl]

0,687 g *Z*-Pro-Pro-His-Leu-Val-Ala-Asp(O*Bu*^{*t*})-Pro-OH [7—14 a] in 100 ml Methanol/Wasser (96:4) werden in Gegenwart von Palladium-Schwarz unter Zutropfen von 13,26 ml 0,1*N* Salzsäure bei *pH* 4—4,5 hydriert. Danach wird die vom Katalysator befreite Lösung im Vak. eingedampft und der Rückstand aus Methanol/Äther umgefällt. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: —63,6° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —76,3° ($c=1$ in DMF). Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60:6:24:20). Ausb. 0,670 g (95% d. Th.).

$\text{C}_{43}\text{H}_{68}\text{N}_{10}\text{O}_{11} \cdot 2\text{HCl} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1064,1). Ber. C 48,54, H 7,58, N 13,16, Cl 6,67.
Gef. C 48,62, H 7,83, N 13,14, Cl 6,75.

L-2-Pyrrolidon-5-carbonyl-*L*-leucyl-glycyl-*L*-prolyl-*L*-glutaminyl-glycyl-*L*-prolyl-*L*-prolyl-*L*-histidyl-*L*-leucyl-*L*-valyl-*L*-alanyl-*L*-asparagyl(β -*tert*-butylester)-*L*-prolin-tetrahydrat [1—14]

Eine Lösung von 0,266 g <Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-OH · 2H₂O [1—6] in 5 ml DMF wird bei 0 °C unter Rühren mit 0,074 g HONSu und 0,098 g DCCD versetzt. Nach 12 h Rühren bei Raumtemp. wird der ausgefallene Harnstoff durch Filtration entfernt, das Filtrat im Hochvak. eingedampft, der Rückstand mit Ether digeriert und abfiltriert. Der erhaltene „rohe“ *N*-Hydroxysuccinimidester wird zusammen mit 0,459 g H-Pro-Pro-His-Leu-Val-Ala-Asp(O*Bu*^{*t*})-Pro-OH · 2HCl · 5H₂O [7—14 b · HCl] in 5 ml DMF gelöst und nach Zugabe von 0,181 ml Triethylamin und 0,034 ml Pyridin drei Tage bei Raumtemp. gerührt.

Das nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Hochvak. erhaltene Material wird an Kieselgel 60 (Merck; Korngröße 0,063—0,2 mm) im Lösungsmittelsystem *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60:6:24:20) säulenchromatographiert. Die gesammelten, reinen Fraktionen werden im Hochvak. eingedampft, der Rückstand in Methanol gelöst, vom Unlöslichen abfiltriert und die klare Lösung im Vak. zur Trockene gebracht. $[\alpha]_D^{20}$: —56,3° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —67,7° (*c* = 1 in *DMF*). Ausb. 0,612 g (92% d. Th.).

$C_{68}H_{105}N_{17}O_{19} \cdot 4H_2O$ (1536,7). Ber. C 53,15, H 7,41, N 15,49.
Gef. C 53,18, H 7,38, N 15,32.

Aminosäureanalyse:								
	Asp	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Leu	His
Ber.	1	2	4	2	1	1	2	1
Gef.	1,00	2,21	3,92	2,00	0,97	0,96	2,11	0,88.

Erstellung der Gesamtsequenz

L-2-Pyrrolidon-5-carbonyl-*L*-leucyl-glycyl-*L*-prolyl-*L*-glutaminyl-glycyl-*L*-prolyl-*L*-histidyl-*L*-leucyl-*L*-valyl-*L*-alanyl-*L*-asparagyl(β-*tert*-butylester)-*L*-prolyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-seryl-*N*^ε-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*N*^ε-*tert*-butyloxycarbonyl-*L*-lysyl-*L*-glutaminyl-glycyl-*L*-prolyl-*L*-tryptophyl-*L*-leucyl-*L*-glutamyl(γ-*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ-*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ-*tert*-butylester)-*L*-glutamyl(γ-*tert*-butylester)-*L*-alanyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-tyrosyl-glycyl-*L*-tryptophyl-*L*-methionyl-*L*-asparagyl(β-*tert*-butylester)-*L*-phenylalaninamid [1—34 a]

a) 0,232 g < Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Pro-His-NHNH₂ · CH₃COOH · H₂O [1—9 b · AcOH] in 5 ml *DMF* und 0,092 ml 5,03 *N* Chlorwasserstoff/Dioxan-Lösung werden bei —5 °C mit 0,033 ml *tert*-Butylnitrit versetzt und das Reaktionsgemisch solange gerührt (~ 30 min) bis kein Hydrazid mehr nachzuweisen ist (Hydrazid-Test!). Nun wird das Gemisch auf —20 °C abgekühlt, mit 0,097 ml Triethylamin neutralisiert und mit einer auf —5 °C gekühlten Lösung von 0,435 g H-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu*^{*t*})-Pro-Ser(*But*^{*t*})-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu(*OBu*^{*t*})-Glu(*OBu*^{*t*})-Glu(*OBu*^{*t*})-Glu(*OBu*^{*t*})-Glu(*OBu*^{*t*})-Ala-Tyr(*But*^{*t*})-Gly-Trp-Met-Asp(*OBu*^{*t*})-Phe-NH₂ · HCl · 4 H₂O [10—34 b · HCl] in 10 ml *DMF* und 0,016 ml Triethylamin versetzt. Nach jeweils 24 h Rühren bei 0 °C und Raumtemp. wird das Lösungsmittel im Hochvak. entfernt, der Rückstand mit Wasser digeriert und getrocknet. Das so erhaltene Tetracontapeptidamid ist chromatographisch nicht rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60:6:24:20). Ausb. 0,492 g Rohprodukt.

$C_{222}H_{339}H_{43}O_{57}S$ (4554,5).

b) Eine Lösung von 0,936 g H-Ser(*But*^{*t*})-Lys(*Boc*)-Lys(*Boc*)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu(*OBu*^{*t*})-Glu(*OBu*^{*t*})-Glu(*OBu*^{*t*})-Glu(*OBu*^{*t*})-Glu(*OBu*^{*t*})-Ala-Tyr(*But*^{*t*})-Gly-Trp-Met-Asp(*OBu*^{*t*})-Phe-NH₂ · HCl · 6H₂O [15—34 b · HCl], 0,04 ml Triethylamin, 0,067 g HONSu und 0,531 g < Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-His-Leu-Val-Ala-Asp(*OBu*^{*t*})-Pro-OH · 4H₂O [1—14] in 20 ml *DMF* wird bei —5 °C mit 0,075 g *DCCD* versetzt. Nach 5tägigem Rühren bei Raumtemp. wird das Lösungsmittel im Hochvak. entfernt, der Rückstand zuerst mit Wasser und anschließend mit Methanol und Ether digeriert. Das erhaltene Material ist chromatographisch nicht rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60:6:24:20). Ausb. 0,947 g Rohprodukt.

$C_{222}H_{339}N_{43}O_{57}S$ (4554,5).

L-2-Pyrrolidon-5-carboxyl-*L*-leucyl-glycyl-*L*-prolyl-*L*-glutaminyl-glycyl-*L*-prolyl-*L*-prolyl-*L*-histidyl-*L*-leucyl-*L*-valyl-*L*-alanyl-*L*-asparagyl-*L*-prolyl-*L*-seryl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-*L*-glutaminyl-glycyl-*L*-prolyl-*L*-tryptophyl-*L*-leucyl-*L*-glutamyl-*L*-glutamyl-*L*-glutamyl-*L*-glutamyl-*L*-alanyl-*L*-tyrosyl-glycyl-*L*-tryptophyl-*L*-methionyl-*L*-asparagyl-*L*-phenylalaninamid (HBG-A) [1—34 b]

0,384 g < Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Pro-His-Leu-Val-Ala-Asp(OBu^t)-Pro-Ser(Bu^t)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-Trp-Met-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂ [1—34 a] (erhalten nach Weg a oder b), 0,3 ml Ethandithiol-(1,2) und 0,3 ml Anisol werden unter Argonatmosphäre mit 50 ml wasserfreier, eiskalter Trifluoressigsäure übergossen und 2 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vak. bis auf ein Volumen von 10 ml entfernt, die Restlösung mit 100 ml abs. Ether versetzt, der gebildete Niederschlag nach 1 h abfiltriert, mit Ether gewaschen und getrocknet. Ausb. 0,322 g Rohprodukt.

C₁₇₆H₂₅₁H₄₃O₅₃S (3849,2).

Reinigung von Roh-Human-Big-Gastrin I

a) *Durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex A-25 (s. Abb. 1)*

Ein mit 0,25 M Ammoniumacetat-Lösung (pH 6,8) äquilibriertes DEAE-Sephadex A-25 (Acetat-Form) wird in eine Chromatographiesäule von 40 cm Länge und 2 cm Innendurchmesser gebracht. Dann gibt man 0,3 g rohes HBG-A [1—34 b] in 15 ml 1% Ammoniak auf die Säule, eluiert zunächst mit 1,8 l 0,25 M Ammoniumacetat-Lösung (Startpuffer) bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 80 ml/h und anschließend mit 1,8 l 0,5 M Ammoniumacetat-Lösung (pH 6,8). Das Eluat wird in Fraktionen zu je 20 ml gesammelt. Die Fraktionen 124—131 werden zusammengefaßt, lyophilisiert und dabei 0,140 g vorgereinigtes Human-Big-Gastrin I (HBG-B) erhalten. Chromatographisch nicht einheitlich in Butanol-(2)/Essigsäure/Wasser/Pyridin (50:6:20:50) auf HPTLC-Fertigplatten (Merck) und Butanol-(2)/Propanol-(2)/0,9proz. wäßrige Monochloressigsäure (30:4:23).

b) *Durch Verteilungschromatographie an Sephadex G-25 (s. Abb. 2)*

Sephadex G-25 (fine) wird in der Unterphase des Lösungsmittelsystems Butanol-(2)/Ethanol/0,1 M Ammoniumacetat-Puffer pH 6,2 (2,5:0,08:2) suspendiert, dann mehrere Stunden darin gequollen und in eine Säule von 200 cm Länge und 4 cm Innendurchmesser gefüllt. Nun wird die Säule mit 2,5 l o. g. Unterphase äquilibriert und anschließend bis zum Durchbruch mit der entsprechenden Oberphase gespült. Dann bringt man die Lösung von 0,135 g des vorgereinigten HBG-B in 20 ml Oberphase auf die Säule und eluiert mit Oberphase bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 80 ml/h. Das Eluat wird in Fraktionen zu je 40 ml gesammelt. Die Fraktionen 48—55 werden vereint, im Vak. vom Butanol-(2) befreit, der Rückstand in 0,5% Ammoniak aufgenommen und die erhaltene Lösung lyophilisiert. Dabei werden 0,105 g HBG-C erhalten. Diese sind dünnstichtchromatographisch noch nicht rein Butanol-(2)/Essigsäure/Wasser/Pyridin (50:6:20:50).

c) *Durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose 23-SH (s. Abb. 3)*

In eine Chromatographie-Säule von 30 cm Länge und 0,9 cm Durchmesser wird ein mit Startpuffer (0,15 M Ammoniumacetat-Lösung pH 7,2) äquilibrier-

ter Ionenaustauscher DEAE-Cellulose 23-SH (Acetat-Form) gefüllt. Man trägt eine Lösung von 0,100 g HBG-C in 5 ml 1% Ammoniak auf die Säule auf, eluiert bei einer Durchfließgeschwindigkeit von 20 ml/h (20 h) mit 0,15 M Ammoniumacetat-Lösung pH 7,2 und anschließend mit 0,2 M Ammoniumacetat-Lösung pH 6,15 (30 h). Das Eluat wird zu je 10 ml-Fractionen gesammelt. Die Fractionen 46—62 werden zusammengefaßt, lyophilisiert und dabei 0,068 g Endprodukt HBG-D erhalten. Dieses erwies sich bis auf eine geringe Menge Methionin-S-oxid-Derivat chromatographisch rein in Butanol-(2)/Essigsäure/Wasser/Pyridin (50:6:20:50) auf HPTLC-Fertigplatten und in der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (s. Abb. 4) (Aminosäurezusammensetzung s. Tab. 1).

Literatur

- 1 Kurzmitteilung: *Wünsch E., Wendlberger G., Mladenova-Ortinova L., Göhring W., Jaeger E., Scharf R., Gregory R. A., Dockray G. J., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **362**, 179 (1981).
- 2 *Choudhury A. M., Kenner G. W., Moore S., Ramage R., Richards P. M., Thorpe W. D., Moroder L., Wendlberger G., Wünsch E.*, in: *Peptides 1976* (Loffet A., Hrsg.), S. 257. Editions de l'Université de Bruxelles. 1976.
- 3 Vorläufige Mitteilung: *Wünsch E., Wendlberger G., Hallett A., Jaeger E., Knof S., Moroder L., Scharf R., Schmidt I., Thamm P., Wilschowitz L., Z. Naturforsch.* **32 e**, 495 (1977).
- 4 *Wendlberger G., Moroder L., Hallett A., Wünsch E.*, *Mh. Chem.* **110**, 1301 (1979).
- 5 *Wendlberger G., Moroder L., Thamm P., Wilschowitz L., Wünsch E.*, *Mh. Chem.* **110**, 1317 (1979).
- 6 *Wendlberger G., Moroder L., Hallett A., Wünsch E.*, *Mh. Chem.* **110**, 1407 (1979).
- 7 *Jaeger E., Gemeiner M., Göhring W., Knof S., Scharf R., Thamm P., Wendlberger G., Wünsch E.*, *Mh. Chem.* **111**, 125 (1980).
- 8 *Gregory R. A., Tracy H.-J.*, in: *Gastrointestinal Hormones* (Thomson J. C., Hrsg.), S. 13. Austin: University of Texas Press. 1975.
- 9 *Gregory R. A.*, *Bioorg. Chem.* **8**, 497 (1979).
- 10 *Dockray G. J., Gregory R. A., Hood L., Hunkapiller M.*, *Bioorg. Chem.* **8**, 465 (1979).
- 11 *Choudhury A. M., Kenner G. W., Moore S., Ramachandran K. L., Thorpe W. D., Ramage R., Dockray G. J., Gregory R. A., Hood L., Hunkapiller M.*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **361**, 1719 (1980).
- 12 *Noyes B. E., Mevarech M., Stein R., Agarwal K. L.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 1770 (1979).
- 13 *Choudhury A. M., Chu K. Y., Kenner G. W., Moore S., Ramachandran K. L., Ramage R.*, *Bioorg. Chem.* **8**, 471 (1979).
- 14 *Wünsch E.*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **332**, 288 (1963).
- 15 *Goldschmidt S., Obermeier F.*, *Ann. Chem.* **588**, 24 (1954).
- 16 *Moroder L., Marchiori F., Borin G., Scoffone E.*, *Biopolymers* **12**, 493 (1973).
- 17 *Wieland T., Bernhard H.*, *Ann. Chem.* **572**, 190 (1951).
- 18 *Boissonnas R. A.*, *Helv. Chim. Acta* **34**, 874 (1951).
- 19 *Vaughan J. R.*, *J. Amer. Chem. Soc.* **73**, 3547 (1951).
- 20 *Wünsch E., Drees F.*, *Chem. Ber.* **99**, 110 (1966).
- 21 *Weygand F., Hoffmann D., Wünsch E.*, *Z. Naturforsch.* **21 b**, 426 (1966).
- 22 *Honzl J., Rudinger J.*, *Coll. Czech. Commun.* **26**, 2333 (1961).