

## Zur Totalsynthese von Human-Sekretin\*

**E. Wunsch, G. Wendlberger, W. Göhring, G. Hübener, und B. Traving**

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

**Summary.** The synthesis of the heptacosapeptide amide with the primary structure of Human-secretin is described. For this purpose 7 fragments were designed, i.e. H-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> <25–27b>, Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-Leu-Leu-Gln-OH <21–24>, Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-Leu-Gln-OH <18–20>, Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-Glu(OtBu)-Gly-Ala-OH <14–17>, Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-Leu-OH <12–13>, Z-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-OH <7–11>, Adoc-His(Adoc)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-OH <1–6>; these fragments were consequently assembled to the overall protected total sequence using the Wunsch/Weygand-method with dicyclohexylcarbodiimide. After deprotection by exposure to trifluoroacetic acid in presence of 1,2-ethanedithiol and water as scavenger, the isolated crude product was purified by column chromatography on CM-Sepharose, fast flow. This synthesized Human-secretin showed the full biological activity in comparison to Porcine-secretin.

**Keywords.** Gastrointestinal hormone; Human-secretin; Synthetic peptide factors.

### Einleitung

Human-Sekretin unterscheidet sich vom Hormon des Schweines, nach einer erfolgreichen Strukturaufklärung von V. Mutt et al. [1] lediglich in den Aminosäure-Positionen 15 und 16, d.h. die Sequenzfolge Aspartyl-Seryl wird beim menschlichen Sekretin durch Glutamyl-Glycyl ersetzt. Für eine Totalsynthese des Human-wirkstoffes sollte diese Sequenzänderung von erheblichem Vorteil sein, da – wie wir in früheren Arbeiten zeigen konnten [2, 3] – der Aufbau des Schweine-Sekretin-Fragmentes (14–17) wegen der Instabilität mehrerer Zwischenstufen mit einer erheblichen Ausbeuteminderung verbunden war.

*Abkürzungen:* Es wurden hier die Abkürzungen für Aminosäuren und Schutzgruppen nach Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Bd. XV, 1 und 2, verwendet.

### Ergebnisse und Diskussion

Für eine – auch technisch verwertbare – Erstellung des synthetischen Human-Wirkstoffes hatten wir uns auch vorgenommen einige „nicht voll befriedigende“

\* Herrn Prof. Dr. E. Bayer zum 65. Geburtstag gewidmet.

Stufen unserer früheren „Schweine-Sekretin“-Synthese zu bearbeiten und ggf. erzielte Verbesserungen für den nunmehrigen Aufbau des Human-Sekretins mit einzubeziehen:

1) Die Teilsequenz <21–27> hatten wir durch einen stufenweisen Anbau der Sequenzbausteine 23, 22 und 21 an das Tetrapeptid-Fragment <24–27>, d.i. H-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub>, erstellt. Die Gewinnung dieses Tetrapeptidamids [4] aus seinem Z-Derivat durch hydrogenolytische Entacylierung führte stets zu wechselnden Mengen an Pyrrolidonyl-tripeptid-amid als unerwünschtem Nebenprodukt.

Viel erfolgreicher verläuft nunmehr die Darstellung dieses Sequenzteilstücks <21–27>, wenn das carboxylendständige Tripeptidamid H-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> mit dem geschützten Tetrapeptid <21–24>, d.i. Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-Leu-Leu-Gln-OH nach dem „erweiterten“ Wunsch-Weygand-Verfahren verknüpft wird – entweder nach der Geiger-Variante mit N-Hydroxybenzotriazol statt N-Hydroxysuccinimid oder mit dem von uns neu aufgefundenen „kombinierten“ N-Hydroxysuccinimid/3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-Zusatz.

Fragment I H-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> wurde ausgehend vom Dipeptidamid H-Leu-Val-NH<sub>2</sub> [4] durch Aufknüpfung des Glycyl-Restes erhalten, Fragment II Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-Leu-Leu-Gln-OH ausgehend vom Glutamin in stufenweisem Anbau von zweimal BOC-Leu-OSU und einmal Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-OSU gewonnen.

2) Die letzte Fragmentverknüpfung bei der Schweine-Sekretin-Synthese, d.i. der Anbau des Fragments Adoc-His(Adoc)-Ser(*t*Bu)-Asp(*O*tBu)-Gly-Thr(*t*Bu)-Phe-OH an das Sequenzteilstück <7–27>-NH<sub>2</sub> verläuft an sich zufriedenstellend, wenn man von einer sehr geringen Razemisierung am carboxylendständigen Phenylalanin-Rest (Pos. 6) absieht. (Dies ist jedoch nur bei dem Carbodiimid/Hydroxysuccinimid-Verfahren der Fall; andere 1,2-Dinucleophil-Zusätze wie z.B. Hydroxybenzotriazol erhöhen die Razemisierung beim Verknüpfungsschritt erheblich [5, 6]).

Eine Verlegung dieses Verknüpfungspunkts, z.B. auf die Positionen 8/9 hatte schon bei unserer Glucagon-Synthese zu keinem Erfolg geführt. Wir wollten deshalb prüfen, ob eine Fragmentverknüpfung zwischen den Sequenzpositionen 5/6 günstigere Ergebnisse zeitigen würde. Hierzu wurde die in der Synthesestrategie vorgesehene Teilsequenz <7–11> zu der Teilsequenz <6–11> aufgestockt, d.i. Z-Phe-Thr(*t*Bu)-Ser(*t*Bu)-Glu(*O*tBu)-Leu-Ser(*t*Bu)-OH; abgesehen von einer zu-

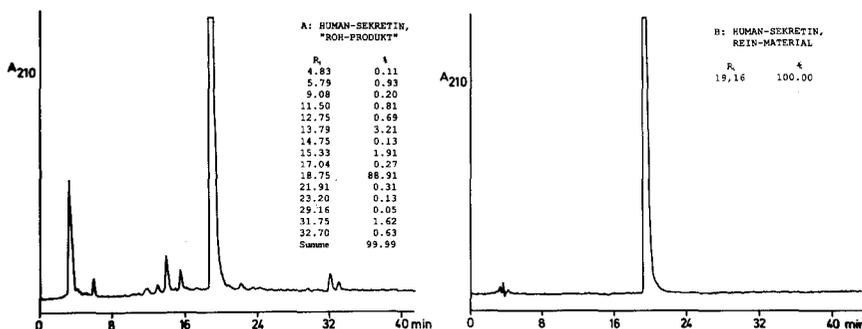


Abb. 1. Hochdruckflüssigkeitschromatographie an Nucleosil 300 C-18-Säule. Elution: Linearer Gradient, 40 min.; 27.5–42.5% Acetonitril/0.5%-iger wäßrige Phosphorsäure; Durchflußgeschwindigkeit 2 ml/min. A: Human-Sekretin, „Roh-Produkt“. B: Human-Sekretin, „Rein-Material“

nehmenden Schwerlöslichkeit gelang diese Verlängerungsstufe ohne Komplikationen. Dagegen zeigten sich aber bei der Erstellung des aminosäureendständigen Fragmentes *Adoc*-His(*Adoc*)-Ser(*tBu*)-Asp(*OtBu*)-Gly-Thr(*tBu*)-OH im Aufbau der Tri- und Tetra-peptid-Stufen große Schwierigkeiten (Auftreten mehrerer Nebenprodukte). Da auch die letztlich vorgenommene Fragmentverknüpfung <1–5> mit <6–27>-NH<sub>2</sub> ausbeutemäßig nicht unseren Erwartungen entsprach, sind wir zur früheren bewährten Aufbaustrategie zurückgekehrt.

Nach diesen „klärenden“ Vorarbeiten wurden für die Totalsynthese des Human-Sekretins 7 Fragmente erstellt, d.s. H-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> <25–27>, Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-Leu-Leu-Gln-OH <21–24>, Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-Leu-Gln-OH <18–20>, Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-Glu(*OtBu*)-Gly-Ala-OH <14–17>, Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-Leu-OH <12–13>, Z-Thr(*tBu*)-Ser(*tBu*)-Glu(*OtBu*)-Leu-Ser(*tBu*)-OH <7–11> und *Adoc*-His(*Adoc*)-Ser(*tBu*)-Asp(*OtBu*)-Gly-Thr(*tBu*)-Phe-OH <1–6> und anschließend in Sequenzfolge verknüpft (s. vorläufige Mitteilung [7]).

Das allseits geschützte Human-Sekretin <1–27>, Rohprodukt, wurde ohne weitere Charakterisierung zur Abspaltung der Schutzgruppen mit Trifluoressigsäure in Gegenwart von 1,2-Ethandithiol und wenig Wasser behandelt, das erhaltene Material der chromatographischen Reinigung an CM-Sepharose, fast flow, (Rechromatographie der Randfraktionen mit gleichem Trennmateriale) unterworfen: Das erhaltene synthetische Human-Sekretin erwies sich in den analytischen Tests (Dünnschichtchromatographie, Hochdruckflüssigkeitschromatographie (s. Abb. 1), Aminosäureanalyse, Enzymatische Spaltung, IR-Absorptionskontrolle auf Säulenchromatographie-Materiale) als hochreines Produkt mit einer, dem Schweine-Sekretin analogen, vollen biologischen Aktivität [7].

## Experimenteller Teil

Die Schmelzpunktbestimmung erfolgte in offenen Kapillaren im Apparat nach Dr. Tottoli. Die Drehwerte wurden im lichtelektrischen Polarimeter von Perkin-Elmer, Modell 241MC, 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 (Eschborn). Die Aminosäureanalyse wurde nach saurer Hydrolyse mit 6N HCl oder nach enzymatischer Verdauung mit Aminopeptidase-M „Boehringer“ am Aminosäure-analysator der Fa. Biotronik LC-6001 durchgeführt, die elementaranalytischen Werte am CHN-O-Rapid-Apparat der Fa. Heraeus ermittelt.

Die für die Säulenchromatographie erforderliche CM-Sepharose, fast flow, wurde von der Fa. Deutsche Pharmacia (Freiburg) bezogen; die Ermittlung der Peptidverteilung in den Eluaten erfolgte durch kontinuierliche Absorptionsmessung mit Durchflußphotometer Uvicord-S/II. Zur Fraktionierung der Eluate wurde ein Fraktionssammler Modell Linear II der Fa. Serva (Heidelberg) verwendet.

### A) Herstellung der Fragmente I–VII

#### Fragment I: H-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> <25–27b>

H-Leu-Val-NH<sub>2</sub> <26–27>, hergestellt aus Z-Val-OH über 4 Stufen und isoliert als Hydrobromid in 83.5%iger Ausbeute [4], wird in Dimethylformamid mit *BOC*-Gly-OSU zum *BOC*-Tripeptid-amid <25–27a> umgesetzt. F.p. = 205–206 °C;  $[\alpha]_D^{20} = -32.9\%$ ;  $[\alpha]_{546}^{20} = -39.2^\circ$  bei  $c = 1$  in Essigsäure; Ausbeute 91%.

Dessen acidolytische Entacylierung mit 1.5*n* Chlorwasserstoff in Essigsäure und Behandeln des intermediären Hydrochlorids in Dimethylformamid mit Kaliumhydrogencarbonat erbrachte das gewünschte Fragment H-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> <25–27b>, CHR rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Essigsäureethylester 3:1:1:5 (F.p. = 220 °C;  $[\alpha]_D^{20} = -55.1^\circ$ ;  $[\alpha]_{546}^{20} = -66.1^\circ$  bei  $c = 1$  in 80% Essigsäure; Ausbeute über alle 6 Stufen 68.4%). Analyse für C<sub>13</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>, M = 286.4; ber. C 54.52, H 9.15, N 19.56; gef. C 54.22, H 9.19, N 19.33.

*Fragment II: Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-Leu-Leu-Gln-OH <21–24>*

H-Leu-Gln-OH <23–24>-hergestellt aus *BOC*-Leu-OSU und H-Gln-OH und isoliert in 89%iger Ausbeute [4] oder aus *Z*-Leu-OSU und H-Gln-OH in analoger Weise aber hydrogenolytischer Entacylierung und isoliert als Hemihydrat in 94.8%iger Ausbeute – wird in Dioxan/Wasser in Gegenwart von 1 Äquivalent Natronlauge und 1 Äquivalent Natriumhydrogencarbonat mit *Z*-Leu-OSU wie üblich umgesetzt und aufgearbeitet: Das in 97.6%iger Ausbeute erhaltene *Z*-Tripeptid <22–24a> (F.p. = 197 °C; Analyse für C<sub>25</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> + 1/2H<sub>2</sub>O, M = 508.61; ber. C 59.04, H 7.93, N 11.02; gef. C 59.89, H 7.60, N 11.07) wird in 90% Methanol in Gegenwart von Pd/Kohle katalytisch entacyliert: H-Leu-Leu-Gln-OH <22–24b> isoliert als Hemihydrat, CHR rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Essigsäureethylester 3:1:1:5. F.p. = 252 °C; Analyse für C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> + 1/2H<sub>2</sub>O, M = 381.47; ber. C 53.53, H 8.72, N 14.69; gef. C 53.63, H 8.50, N 14.81.

Das in quantitativer Ausbeute erhaltene freie Tripeptid <22–24b> wird in wäßrigem Dioxan in Gegenwart von je 1 Äquivalent Natronlauge und Kaliumhydrogencarbonat mit *Z*-Arg(Z<sub>2</sub>)-OSU in bekannter Manier umgesetzt und aufgearbeitet: *Z*-Arg(Z<sub>2</sub>)-Leu-Leu-Gln-OH <21–24>; Ausbeute 96.5% bzw. Ausbeute über alle 5 Stufen 80.9%; CHR rein in *n*-Heptan/*t*-Butanol/Essigsäure 3:2:1. F.p. = 182–185 °C;  $[\alpha]_D^{20} = -17.3^\circ$ ;  $[\alpha]_{546}^{20} = -20.7^\circ$  bei  $c = 1$  in Dimethylformamid; Analyse für C<sub>47</sub>H<sub>62</sub>N<sub>8</sub>O<sub>12</sub>, M = 931.07; ber. C 60.63, H 6.71, N 12.04; gef. C 60.35, H 6.63, N 11.84.

*Fragment III: Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-Leu-Gln-OH <18–20>*

Dieses geschützte Tripeptid wird nach [4] hergestellt und mit gleicher Ausbeute und gleichen analytischen Daten erhalten (Ausbeute: 63.2%).

*Fragment IV: Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-Glu(OtBu)-Gly-Ala-OH <14–16>*

H-Ala-OH in wäßrigem Dioxan – 5% mehr als die berechnete Menge + 1 Äquivalent Natronlauge – werden mit *Z*-Gly-OSU unter Zugabe von 1 Äquivalent Natriumhydrogencarbonat wie üblich umgesetzt und aufgearbeitet: *Z*-Gly-Ala-OH <16–17a>; Ausbeute 90%. F.p. = 129–131 °C;  $[\alpha]_D^{20} = -9.64^\circ$ ;  $[\alpha]_{546}^{20} = -11.4^\circ$  bei  $c = 1$  in Ethanol; Analyse für C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, M = 280.28; ber. C 55.71, H 5.75, N 9.99; gef. C 55.75, H 5.63, N 9.97.

Genanntes *Z*-Dipeptid <16–17a> wird in Methanol/Wasser 3:1 in Gegenwart von Pd/Kohle katalytisch entacyliert, die Lösung nach Filtrieren vom Katalysator wie üblich aufgearbeitet und aus Ethanol kristallisiert: H-Gly-Ala-OH <16–17b>; Ausbeute 95.2%. F.p. = 220 °C (*Z*); Analyse für C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, M = 146.15; ber. C 41.09, H 6.90, N 19.17; gef. C 40.98, H 6.81, N 19.09.

Vorstehendes Dipeptid <16–17b> wird in verd. Natronlauge und Dioxan mit *Z*-Glu(OtBu)-OSU in Gegenwart von 1 Äquivalent Natriumhydrogencarbonat wie üblich umgesetzt, aufgearbeitet und der Rückstand aus Diisopropylether kristallisiert: *Z*-Glu(OtBu)-Gly-Ala-OH <15–17a>; Ausbeute 90%. F.p. = 106–107 °C;  $[\alpha]_D^{20} = -14.35^\circ$ ;  $[\alpha]_{546}^{20} = -16.65^\circ$  bei  $c = 1$  in Methanol; Analyse für C<sub>22</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>, M = 465.5; ber. C 56.76, H 6.71, N 9.03; gef. C 56.56, H 6.70, N 8.93).

Das oben erhaltene *Z*-Tripeptid <15–17a> wird in 80% Methanol in Gegenwart von Pd/Kohle wie üblich hydrogenolytisch entacyliert: H-Glu(OtBu)-Gly-Ala-OH <15–17b>; Ausbeute 87.4%. F.p. = 205 °C (*Z*);  $[\alpha]_D^{20} = +15.63^\circ$ ;  $[\alpha]_{546}^{20} = +18.58^\circ$  bei  $c = 1$  in Methanol; Analyse für C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>, M = 331.37; ber. C 50.75, H 7.60, N 12.68; gef. C 50.47, H 7.52, N 12.76).

Das erhaltene Tripeptid <15–17b> wird in wäßrigem Dioxan und 1 Äquivalent Natronlauge mit Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-OSU in Gegenwart von 1 Äquivalent Natriumhydrogencarbonat wie üblich umgesetzt, aufgearbeitet und aus Essigsäureethylester kristallisiert:

Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-Glu(OtBu)-Gly-Ala-OH <14–17>; Ausbeute 77.6% bzw. 52.3% über alle 5 Stufen. F.p. = 154–158 °C;  $[\alpha]_D^{20} = -2.89^\circ$ ;  $[\alpha]_{546}^{20} = -3.61^\circ$  bei  $c=1$  in Dimethylformamid; bzw.  $[\alpha]_D^{20} = -6.05^\circ$ ;  $[\alpha]_{546}^{20} = -7.06^\circ$  bei  $c=1$  in Essigsäure; CHR rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 3:1:1 bzw. *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin/Essigsäureethylester 60:6:24:20:110 bzw. Chloroform/Trifluorethanol/Propionsäure/Wasser 25:5:4:1; Analyse für C<sub>44</sub>H<sub>55</sub>N<sub>7</sub>O<sub>13</sub>, M = 889.6; ber. C 59.38, H 6.23, N 11.02; gef. C 59.21, H 6.23, N 10.85).

Fragment V: Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-Leu-OH <12–13>

Fragment VI: Z-Thr(*t*Bu)-Ser(*t*Bu)-Glu(OtBu)-Leu-Ser(*t*Bu)-OH <7–11>

Fragment VII: Adoc-His(Adoc)-Ser(*t*Bu)-Asp(OtBu)-Gly-Thr(*t*Bu)-Phe-OH <1–16>

Diese Peptid-Derivate <12–13>, <7–11> und <1–6> werden nach den Vorschriften der Literatur [3], [8], [9] mit analoger Ausbeute und gleichen analytischen Daten erstellt.

## B) Verknüpfung der Fragmente

### 1. Sequenzteilstück 21–27

H-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> <21–27b>

H-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> <25–27b = Fragment I> – 10% Überschuß – und Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-Leu-Leu-Gln-OH <21–24 = Fragment II> werden in Dimethylformamid mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von je 1 Äquivalent Hydroxysuccinimid und Hydroxyoxobenzotriazin versetzt, die Reaktionsmischung zunächst 6 h bei –5 °C und dann 3 Tage bei RT gerührt, nach Abtrennen des gebildeten Harnstoffderivats im Vak. weitgehend eingeeengt. Das ausgefallene Produkt wird abfiltriert, mit siedendem Methanol gewaschen und anschließend noch erschöpfend mit heißem Essigsäureethylester digeriert:

Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> <21–27a> isoliert als Monohydrat; Ausbeute 81.6%. F.p. = 261–262 °C; Analyse für C<sub>60</sub>H<sub>87</sub>N<sub>12</sub>O<sub>14</sub> + H<sub>2</sub>O, M = 1218.43; ber. C 59.14, H 7.36, N 13.79; gef. C 59.15, H 7.21, N 13.99.

Dieses Material – Benzyloxycarbonyl-heptapeptidamid <21–27a> – wird in Essigsäure in Gegenwart von Pd/Kohle hydriert; das Filtrat vom Katalysator wird im Vak. zur Trockene gebracht, der verbliebene Rückstand aus Methanol/Diethylether umgefällt, dann in 90% Methanol gelöst, mit 2 Äquivalenten *n* Bromwasserstoff versetzt und die Mischung sofort in viel Diethylether eingerührt; der flockige Niederschlag wird abfiltriert und im HV getrocknet: H-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> <21–27b> isoliert als Hydrobromid-Dihydrat; Ausbeute quantitativ. F.p. = 165–170 °C;  $[\alpha]_D^{20} = -34.4^\circ$ ;  $[\alpha]_{546}^{20} = -41.0^\circ$  bei  $c=1$  in Essigsäure; CHR rein in Chloroform/Trifluorethanol/Propionsäure/Wasser 25:5:4:1; bzw. *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 3:1:1; Analyse für C<sub>36</sub>H<sub>69</sub>N<sub>12</sub>O<sub>8</sub>Br + HBr + 2H<sub>2</sub>O, M = 994.9; ber. C 43.46, H 7.50, N 16.89, Br 16.05; gef. C 43.24, 7.48, 16.61, 16.06; Aminosäureanalyse: Arg 1.02, Leu 2.94, Glu 1.03, Gly 1.02, Val 0.98; Razemattest (*D*-Anteil in %): Arg <0.5, Leu 0.8, Glu 0.4, Val <0.5.

### 2. Sequenzteilstück 18–27

H-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-HN<sub>2</sub> <18–27b>

Je 1 Äquivalent vorher genanntes Sequenzteilstück 21–27 und Fragment III, d.i. Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-Leu-Gln-OH <18–20>, in Dimethylformamid, werden unter Zusatz von je 1 Äquivalent Hydroxysuccinimid,

Hydroxyoxobenzotriazin und Triethylamin mit Dicyclohexylcarbodiimid wie üblich umgesetzt. Die Reaktionsmischung wird 6 h unter Eiskühlung und anschließend 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich eine gallertige Masse bildet; diese wird abfiltriert, sorgfältig mit heißem Essigsäureethylester gewaschen, anschließend mehrfach mit Methanol/Essigsäureethylester digeriert und im HV getrocknet:

*Z*-Arg(*Z*<sub>2</sub>)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> <18–27a> isoliert als Tetrahydrat; Ausbeute 93.4%. F.p. = 244–247 °C (*Z*);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -30.77^\circ$ ;  $[\alpha]_{546}^{20} = -36.17^\circ$  bei  $c = 1$  in 80% Essigsäure; Analyse für C<sub>77</sub>H<sub>118</sub>N<sub>19</sub>O<sub>18</sub>Br + 4H<sub>2</sub>O, M = 1749.26; ber. C 52.85, H 7.26, N 15.21, Br 4.57; gef. C 52.83, H 7.16, N 15.43, Br 4.37; Aminosäureanalyse: Arg 1.94, Leu 3.92, Gln 2.05, Gly 1.02, Val 1.0; Razemattest (*D*-Anteil in %): Arg <0.5, Leu 1.0, Gln <0.6, Val <0.5.

Obiges geschütztes Dekapeptidamid <18–27a> wird in 85%iger Methanol in Gegenwart von Pd/Kohle hydrogenolytisch entacyliert unter gleichzeitiger Titration mit *n* Bromwasserstoffsäure bei *pH* 3.5. Das Filtrat vom Katalysator wird im Vak. zur Trockene gebracht, der Rückstand aus wenig Methanol/Essigsäureethylester zweimal umgefällt, das abfiltrierte Material mit Diethylether gewaschen und im HV getrocknet:

H-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> <18–27b> isoliert als Hydrobromid; Ausbeute 85.1%. F.p. = 180–185 °C (*Z*);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -40.92^\circ$ ;  $[\alpha]_{546}^{20} = -48.78^\circ$  bei  $c = 1$  in 80% Essigsäure; CHR rein in Chloroform/Trifluorethanol/Propionsäure/Wasser 25:5:4:1 und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 3:1:1 und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin 60:6:24:20; Analyse für C<sub>53</sub>H<sub>101</sub>N<sub>19</sub>O<sub>12</sub>Br<sub>2</sub> + HBr, M = 1437.28; ber. C 43.74, H 7.20, N 18.29, Br 16.47; gef. C 43.50, H 7.21, N 17.96, Br 16.28.

### 3. Sequenzteilstück 14–27

H-Arg(HBr)-Glu(*OtBu*)-Gly-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> <14–27b>

Dekapeptidamid-hydrobromid <18–27b> und *Z*-Arg(*Z*<sub>2</sub>)-Glu(*OtBu*)-Gly-Ala-OH <14–17a = Fragment IV> – 20%iger Überschub – werden in Dimethylformamid bei –10 °C nach Zugabe von 2 Äquivalenten Hydroxysuccinimid und 1 Äquivalent Triethylamin mit Dicyclohexylcarbodiimid – 20%iger Überschub – versetzt. Die Reaktionsmischung wird 6 h unter Eiskühlung und anschließend 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt, im Vak. auf mindestens die Hälfte reduziert und mit Essigsäureethylester im Überschub versetzt. Das ausgefallene Produkt wird abfiltriert, erschöpfend mit Wasser digeriert, aus Ethanol/Essigsäureethylester umkristallisiert und letztlich im HV getrocknet: *Z*-Arg(*Z*<sub>2</sub>)-Glu(*OtBu*)-Gly-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> <14–27a> isoliert als Monohydrat; Ausbeute 97%. F.p. = 205–208 °C (*Z*); CHR rein in Chloroform/Trifluorethanol/Propionsäure/Wasser 25:5:4:1 und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 3:1:1 und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin 60:6:24:20; Analyse für C<sub>57</sub>H<sub>154</sub>N<sub>26</sub>O<sub>24</sub>Br<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O, M = 2246.27; ber. C 51.67, H 7.00, N 16.21, Br 7.11; gef. C 51.76, H 7.04, N 15.91, Br 6.90; Aminosäureanalyse: Arg 2.92; Glu 3.09, Gly 1.98, Ala 1.0, Leu 3.98, Val 1.02; Razemattest (*D*-Anteil in %): Arg 0.4, Glu 1.2, Ala 2.3, Leu 1.6, Val 0.2.

Obiges geschütztes Tetradekapeptidamid <14–27a> wird in 95% wäßrigem Methanol in Gegenwart von Pd/Kohle unter gleichzeitiger Titration mit 0.5*n* Bromwasserstoff bei *pH* = 4 hydrogenolytisch entacyliert, wobei zweckmäßigerweise die Mischung bei 35 °C gehalten wird. Das Filtrat vom Katalysator wird im Vak. eingengt, der Rückstand zweimal aus Methanol/Methyl-*tert*-butylether umgefällt und im HV getrocknet:

H-Arg(HBr)-Glu(*OtBu*)-Gly-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> <14–27b> isoliert als Hydrobromid; Ausbeute 96.9%. F.p. = 125–135 °C (*Z*); CHR rein in Chloroform/Trifluorethanol/Propionsäure/Wasser 25:5:4:1 und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 3:1:1 und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin 60:6:24:20;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -26.7^\circ$ ;  $[\alpha]_{546}^{20} = -32.6^\circ$  bei  $c = 1$  in 80% Essigsäure; Analyse für C<sub>73</sub>H<sub>138</sub>N<sub>26</sub>O<sub>18</sub>Br<sub>4</sub>, M = 1987.73; ber. C 44.11, H 7.00, N 18.32, Br 16.08; gef. C 43.97, H 7.09, N 18.25, Br 15.84.

## 4. Sequenzteilstück 12–27

H-Arg(HBr)-Leu-Arg(HBr)-Glu(OtBu)-Gly-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> <12–27b>

Tetradeka-peptidamid-hydrobromid <14–27b> und Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-Leu-OH <12–13 = Fragment V> – 40% Überschuß – in Dimethylformamid werden bei –10 °C nach Zusatz von 2 Äquivalenten Hydroxysuccinimid (bezogen auf Fragment V) und 1 Äquivalent Triethylamin (bezogen auf das Tetradeka-peptidamid-hydrobromid) mit Dicyclohexylcarbodiimid – 10% Überschuß bezogen auf das Tetradeka-peptidamid-derivat – versetzt. Die Reaktionsmischung wird 8 h unter Eiskühlung, anschließend 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach erneuter Abkühlung auf 0 °C filtriert man vom Harnstoff ab, dampft im Vak. auf 2/3 ein und rührt letztlich langsam in viel Essigsäureethylester ein. Die gebildete Fällung wird abfiltriert, im HV getrocknet und anschließend zwischen *n*-Butanol und Wasser verteilt, die Butanol-Phase sodann im Vak. eingedampft, der Rückstand mit Methanol und Diisopropylether verrührt, wobei Kristallisation eintritt. Nach Abdekantieren der Lösungsmittel wird nochmals mit Methanol/Isopropanol und dann mit Diethylether digeriert, abfiltriert und im HV getrocknet:

Z-Arg(Z<sub>2</sub>)-Leu-Arg(HBr)-Glu(OtBu)-Gly-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> <12–27a>; Ausbeute 85.5%. CHR in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 3:1:1 und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin 60:6:24:20; Analyse für C<sub>109</sub>H<sub>178</sub>N<sub>31</sub>O<sub>26</sub>Br<sub>3</sub>, M = 2578.55; ber. C 50.77, H 6.96, N 16.84, Br 9.30; gef. C 50.45, H 7.14, N 16.48, Br 9.12; Aminosäureanalyse: Arg 3.90, Glu 2.99, Gly 2.0, Ala 1.03, Leu 4.92, Val 1.01; Razemattest (*D*-Anteil in %): Arg <0.5, Glu 0.6, Ala <0.5, Leu 1.3, Val <0.5.

Obiges geschütztes Hexadeka-peptidamid <12–27a> wird in 95% Methanol in Gegenwart von Pd/Kohle unter gleichzeitiger Titration mit 0.1*n* Bromwasserstoff bei *pH* = 4 katalytisch entacyliert. Das Filtrat vom Katalysator wird im Vak. eingedampft, der Rückstand in Methanol suspendiert und nach Zugabe von Diethylether 12 h verrührt; das abfiltrierte Produkt wird mit Ether gewaschen und letztlich aus Methanol/Methyl-*tert*-butylether umgefällt:

H-Arg(HBr)-Leu-Arg(HBr)-Glu(OtBu)-Gly-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> <12–27b> isoliert als Hydrobromid; Ausbeute 90%. CHR in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 3:1:1 und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin 60:6:24:20; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = –27.2°; [α]<sub>546</sub><sup>20</sup> = –33.4° bei *c* = 1 in 80% Essigsäure; Analyse für C<sub>85</sub>H<sub>161</sub>N<sub>31</sub>O<sub>20</sub>Br<sub>4</sub> + HBr, M = 2337.93; ber. C 43.67, H 6.98, N 18.57; gef. C 43.57, H 7.19, N 18.55.

## 5. Sequenzteilstück 7–27

H-Thr(*tBu*)-Ser(*tBu*)-Glu(OtBu)-Leu-Ser(*tBu*)-Arg(HBr)-Leu-Arg(HBr)-Glu(OtBu)-Gly-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> <7–27b>

1 Äquivalent Hexadeka-peptidamid hydrobromid <12–27b> und 2 Äquivalente Z-Thr(*tBu*)-Ser(*tBu*)-Glu(OtBu)-Leu-Ser(*tBu*)-OH <7–11 = Fragment VI> in Dimethylformamid/Dimethylacetamid 5:1 werden nacheinander mit 4 Äquivalenten Hydroxysuccinimid, 1 Äquivalent Triethylamin und 4 Äquivalenten Dicyclohexylcarbodiimid versetzt; die Reaktionsmischung wird 10 h unter Eiskühlung und anschließend 3 Tage bei Raumtemperatur gehalten, im HV auf 1/3 Volumen reduziert und mit der 4-fachen Menge Essigsäureethylester versetzt. Das ausgefallene Material wird abfiltriert, das getrocknete und pulverisierte Rohprodukt nacheinander mit Wasser und Methanol/Essigsäure digeriert und letztlich im HV getrocknet:

Z-Thr(*tBu*)-Ser(*tBu*)-Glu(OtBu)-Leu-Ser(*tBu*)-Arg(HBr)-Leu-Arg(HBr)-Glu(OtBu)-Gly-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> <7–27a>; Ausbeute 90.8%. CHR in Chloroform/Trifluorethanol/Propionsäure/Wasser 25:5:4:1 bzw. in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 3:1:1 und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin 60:6:24:20; Analyse für C<sub>130</sub>H<sub>234</sub>N<sub>36</sub>O<sub>32</sub>Br<sub>4</sub>, M = 3133.18; ber. C 49.83, H 7.53, N 16.09, Br 10.20; gef. C 50.16, H 7.81, N 16.09, Br 9.63; Aminosäureanalyse: Ala

1.03, Arg 3.77, Glu 3.96, Gly 2.0, Leu 5.74, Val 0.98; Razemattest (*D*-Anteil in %): Thr <1.0, Ser 0.9, Glu 0.9, Ala 0.6, Val <0.5, Leu 1.6, Arg 0.3).

Vorstehendes geschütztes Undekosa-peptidamid <7–27a> wird in 90% wäßrigem Trifluorethanol in Gegenwart von Pd/Kohle hydrogenolytisch entacyliert. Nach Zugabe der berechneten äquivalenten Menge 0.1*n* Bromwasserstoffsäure wird vom Katalysator abfiltriert, das Filtrat im Vak. eingedampft und der verbliebene Rückstand in Methanol aufgenommen; auf vorsichtige Zugabe von Essigsäureethylester und Diethylether tritt Fällung ein, die abfiltriert und im HV getrocknet wird:

H-Thr(*tBu*)-Ser(*tBu*)-Glu(*OtBu*)-Leu-Ser(*tBu*)-Arg(HBr)-Leu-Arg(HBr)-Glu(*OtBu*)-Gly-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> <7–27b> isoliert als Hydrobromid; Ausbeute 92.9%. CHR in Chloroform/Trifluorethanol/Propionsäure/Wasser 25:5:4:1 bzw. in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 3:1:1 und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin 60:6:24:20; Analyse für C<sub>122</sub>H<sub>228</sub>N<sub>36</sub>O<sub>30</sub>Br<sub>4</sub> + HBr, M = 3079.98; ber. C 47.58, H 7.49, N 16.37, Br 12.97; gef. C 47.42, H 7.48, N 16.02, Br 12.60. Aminosäureanalyse: Thr 0.99, Ser 2.03, Glu 3.99, Gly 2.00, Ala 1.02, Val 1.00, Leu 5.80, Arg 3.95; Razemattest (*D*-Anteil in %): Thr <1.0, Ser <1.0, Glu 1.0, Ala 0.8, Val <0.5, Leu 0.6, Arg 0.5.

#### 6. Gesamtsequenz 1–27b, Rohprodukt

H-His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Arg-Leu-Arg-Glu-Gly-Ala-Arg-Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> <1–27b>

77.8 g (25.25 mmol) Undekosa-peptidamid hydrobromid <7–27b> werden in 1500 ml Trifluorethanol und 20 ml Wasser gelöst, 71 g (58.9 mmol) *Adoc*-His(*Adoc*)-Ser(*tBu*)-Asp(*OtBu*)-Gly-Thr(*tBu*)-Phe-OH <1–6> und 9.2 g (80 mmol) N-Hydroxysuccinimid hinzugefügt. Nach erfolgter Lösung wird das Gemisch auf –20 °C abgekühlt, 1500 ml Dimethylformamid langsam zugegeben (–20 °C halten), anschließend 3.1 ml (25.25 mmol) Triethylamin und schließlich 12.4 g (60 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid hinzugegeben.

Nach 3-tägigem Rühren bei 0 °C werden nochmals 35.6 g (30 mmol) Hexapeptid-derivat <1–6> 4.6 g (40 mmol) N-Hydroxysuccinimid und 7 g (34 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid zugesetzt und die Reaktionsmischung weitere 60 h unter Erreichen von Raumtemperatur gerührt. Danach wird im Vak. zur Entfernung des Trifluorethanol eingedampft, die verbleibende Dimethylformamid-Lösung in viel Essigsäureethylester eingerührt, der gebildete Niederschlag abfiltriert, sorgfältig mit heißem Essigsäureethylester gewaschen und letztlich im HV getrocknet:

*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)-Glu(*OtBu*)-Gly-Ala-Arg(HBr)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> <1–27a>.

Ausbeute: 105 g. Aminosäureanalyse: Asp 1.00, Thr 1.91, Ser 2.90, Glu 3.91, Gly 2.96, Ala 1.04, Val 0.97, Leu 5.70, Phe 1.01, His 0.95, Arg 3.83; Razemattest (*D*-Anteil in %): Asp 1.8, Thr <1.0, Ser <1.0, Glu 0.4, Ala <1.0, Val <0.5, Leu 0.7, Phe 0.5, His 1.5, Arg 0.5.

Vorstehendes geschütztes Heptacosa-peptidamid <1–27a> (10 g) werden unter Argonatmosphäre zunächst mit 3 ml Wasser und 1,5 ml 1,2-Ethandithiol versetzt und anschließend mit 150 ml eiskalter Trifluoressigsäure übergossen. Die Mischung wird 3¼ h bei 0 °C und später bei Raumtemperatur gerührt, die erhaltene Lösung unter Rühren mit 750 ml abs. Diethylether versetzt, der gebildete Niederschlag abfiltriert, sorgfältig mit Diethylether gewaschen und im HV getrocknet:

H-His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Arg-Leu-Arg-Glu-Gly-Ala-Arg-Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub> <1–27b>, Rohprodukt Ausbeute: 8.2 g. Aminosäureanalyse (Peptidhydrolyse mit Aminopeptidase-M „Boehringer“): Asp 1.00, Thr 1.92, Ser 2.89, Gln 1.93, Glu 2.13, Gly 2.87, Ala 1.01, Val 0.90, Leu 6.11, Phe 1.01, His 0.99, Arg 0.37 + Cit 3.4: [enzymbedingte Aufspaltung].

## C) Reindarstellung des Human-sekretins

## I) Vorreinigung über CM-Sepharose

(Zur Abtrennung stark gefärbter Verunreinigungen)

8.2 g <1–27b> Rohprodukt, gelöst in 70 ml 0.1 m Essigsäure werden auf eine mit CM-Sepharose, Fast-Flow-NH<sub>4</sub>-Form, gefüllte Säule (5 × 7.5 cm), die mit 0.2M NH<sub>4</sub>-Acetat/2-Propanol-Puffer (1:1), pH 9.5, equilibriert wurde, aufgetragen. Die Säule wird solange mit 2.5M NH<sub>4</sub>-Acetat/2-Propanol-Puffer (1:1) pH 8.5 eluiert, bis die bekannte UV-Absorption nicht mehr nachweisbar ist (UV-Absorption 206 nm). Das Eluat wird mit der dreifachen Menge Wasser verdünnt und anschließend lyophilisiert. Ausbeute: 8.4 g.

## II) Ionenaustauschchromatographie an CM-Sepharose

Eine mit CM-Sepharose, Fast-Flow, NH<sub>4</sub>-Form, gefüllte Säule (5.5 × 55 cm) wird mit 0.06M NH<sub>4</sub>-Acetat/2-Propanol-Puffer (1:1), pH 6.8, bei einer Flußrate von 550 ml/h equilibriert. 2.8 g vorgereinigtes Rohprodukt (s.o.) in 100 ml 0.1 m Essigsäure – Millipore-filtriert (0.45 m) – werden auf die Säule gegeben; bei einer Flußrate von 550 ml/h (Druck stationäre Phase ~4bar) wird mit dem gleichen NH<sub>4</sub>-Acetat/2-Propanol-Puffer eluiert (UV-Detektion: 206 nm Uvicord S).

Das Peptid-material wird in 200 ml-Fractionen aufgefangen, diese mit der dreifachen Menge Wasser verdünnt und lyophilisiert. Die erhaltenen Fractionen werden getrennt mit analytischer HPLC auf Reinheit geprüft und entsprechend gepoolt.

Ausbeute aus 3 gleichen Ansätzen: a) 3224 mg und b) 2180 mg Randfractionen; Aus b) nach Rechromatographie auf der gleichen Säule weitere 800 mg reines Material. Gesamtausbeute: 4024 mg; Peptidgehalt: 82% = 3300 mg „freies Peptid“ (= 45.2% d. Theorie ber. über die letzten 3 Stufen bez. auf eingesetztes analytisch reines Sequenzteilstück <7–27b>). Aminosäureanalyse (Peptidhydrolyse mit 6N HCl): Asp 1.04, Thr 2.01, Ser 2.94, Gln + Glu 3.94, Gly 2.92, Ala 1.05, Val 1.00, Leu 5.60, Phe 1.02, His 1.00, Arg 3.96; Aminosäureanalyse (Peptidhydrolyse mit Aminopeptidase-M „Boehringer“): Asp 0.96, Thr 1.94, Ser 3.00, Gln 1.92, Glu 2.07, Gly 2.87, Ala 1.04, Val 1.00, Leu 6.10, Phe 1.05, His 0.99, Arg 0.5 + Cit 3.42: [enzymbedingte Aufspaltung].

## Dank

Herrn Dr. Ch. Beglinger, Kantonsspital, Basel, Schweiz, sind wir für die Vergleichs-Wirkungs-Studien Human-Schweine-Sekretin, Herrn Dr. J. Beythien und Frau R. Scharf für die Mitarbeit vor allem bei den ersten Reindarstellungsversuchen zu hohem Dank verpflichtet.

## Literatur

- [1] Carlquist M., Jörnvall H., Forssmann W.-G., Thulin L., Johansson C., Mutt V. (1985) IRCS Med. Sci. **13**: 217
- [2] Wunsch E. (1972) Zur Synthese von biologisch voll-aktivem Sekretin. Naturwissenschaften **59**: 239–246
- [3] Wunsch E., Wendlberger G., Thamm P. (1971) Zur Synthese des Sekretins, II. Darstellung der Sequenz 12–27. Chem. Ber. **104**: 2445–2453
- [4] Wunsch E., Wendlberger G., Högel A. (1971) Zur Synthese des Sekretins, I. Darstellung der Sequenz 18–27. Chem. Ber. **104**: 2430–2444
- [5] Wunsch E. (1983) Peptide Factors as Pharmaceuticals: Criteria for Application. Biopolymers **22**: 439–505
- [6] Göhring W., Scharf R., Wunsch E., Gespach Ch. (1984) Analytical Studies on Side Products in the Synthesis of Secretin. Chemistry of Peptides and Proteins **2**: 137–144

- [7] Wendlberger G., Göhring W., Hübener G., Scharf R., Beythien J., Beglinger Ch., Wünsch E. (1988) Synthesis of Human Secretin. Peptides, Proc. 10th. Amer. Pept. Symp. (Marshall G. R. ed.) Escom, Leiden, 287–288
- [8] Wünsch E., Thamm P. (1971) Zur Synthese des Sekretins, III. Darstellung der Sequenz 7–11. Chem. Ber. **104**: 2454–2457
- [9] Wünsch E., Wendlberger G., Spangenberg, R. (1971) Zur Synthese des Sekretins, IV. Darstellung der Sequenz 1–6. Chem. Ber. **104**: 3854–3858

*Eingegangen 3. August 1992. Angenommen 2. September 1992*