

Zur Synthese von Norleucin-13-Motilin (vorläufige Mitteilung)

The Total Synthesis of Norleucine-13-Motilin (Preliminary Communication)

E. WÜNSCH, J. C. BROWN*, K.-H. DEIMER, F. DREES, E. JAEGER, J. MUSIOL,
R. SCHAFER, H. STOCKER, P. THAMM und G. WENDLBERGER

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

Herrn Prof. Dr. W. GRASSMANN,
emerit. Direktor des Max-Planck-Instituts für Eiweiß- und Lederforschung,
anlässlich seines
75. Geburtstages

in Würdigung seiner großen Verdienste um die Förderung der Peptidchemie,
eines dem Institut durch Prof. Dr. MAX BERGMANN verbundenen Zweiges der wissenschaftlichen Forschung,
gewidmet

(Z. Naturforsch. 28 c, 235–240 [1973]; eingegangen am 19. Februar 1973)

The synthesis of a norleucine analog of the gastric motility increasing and pepsin output stimulating hormone motilin, a linear oligopeptide with 22 amino acid residues, is described: The preparation of 6 partial sequences was carried out at first. The side-chain functions of poly-functional amino acids were protected with groups based on tertiary alcohols and easily removable by acidolysis; the complex function of arginin was masked partially by N_w , N_a -diacylation and partially by protonisation. Subsequently the 6 fragments were condensed to yield the protected total sequence [1-22]; after cleavage of all protective groups the crude synthetic product was purified successfully by ion exchange chromatography.

Bei der Reindarstellung des gastro-intestinalen Hormons Sekretin aus einem Duodenal-Extrakt durch Chromatographie an Carboxymethyl-Cellulose¹ fiel eine Nebenfraktion an, die intravenös appliziert die motorische Aktivität im Fundus-Pouch und ebenso im denervierten Antrum-Pouch signifikant erhöhte sowie einen Pepsin-Ausstoß bewirkte ohne einer in das Gewicht fallenden Steigerung der H^+ -Sekretion. Der „Wirkstoff-Komponente“ dieser Fraktion wurde der Name Motilin gegeben.

Nach Refraktionierung an Carboxymethylcellulose (= Fraktion M₁), anschließender Gel-Filtration an Sephadex G25 (= Fraktion M₂) und letztlich Fraktionierung an TEAE-Cellulose (= Fraktion M₃) konnten BROWN, MUTT und DRYBURGH aus 12,0 g

partiell-gereinigtem Sekretin 5,7 mg hochaktives Material erhalten mit einer biologischen Aktivität von 8-10 000 Einheiten/mg².

Erneute Sephadex G-25-Gel-Filtration der M₃-Fraktion incl. „Entsalzungslauf“ erbrachte ein chromatographisch reines „ninhydrin- und phenanthrenchinon-positives“ M₄-Produkt von der biologischen Aktivität 10 000 Einheiten/mg und einer wahrscheinlichen Dokosa-Peptid-Struktur mit dem kalkulierten Molekular-Gewicht 2 700^{3,4}.

Mit den bisher üblichen Methoden der Strukturaufklärung von Peptiden und Proteinen, d. s.

- Sequenzierung nach dem Dansyl-Ediman-Verfahren⁵ von zahlreichen, sich teilweise überlappenden Spaltstücken aus Bromcyan-, Trypsin-, Chymotrypsin- und Thermolysin-Abbauschritten (einzel oder kombiniert vorgenommen),
- Endgruppenbestimmung für das Aminoende mit Hilfe der Dansyl-Methode modifiziert nach BRUTON und HARTLEY⁶ und für das Carboxy-Ende mit Carboxypeptidase A,

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. E. Wünsch, Max-Planck-Institut für Biochemie, Arbeitsgruppe für Peptidchemie, D-8000 München 2, Schillerstraße 42.

* Als Guest; gegenwärtige Anschrift: Department of Physiology and Surgery Univ. of British Columbia, Vancouver, Canada.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

c. Amid-Gruppen-Ermittlung elektrophoretisch⁷ bei pH = 6,5 konnte die Motilin-Primärstruktur wie folgt festgelegt werden:

H-Phe-Val-Pro-Ile-Phe-Thr-Tyr-Gly-Glu-Leu-Gln-Arg-Met-Glu-Glu-Lys-Glu-Arg-Asn-Lys-Gly-Gln-OH.

Wir waren uns klar darüber, daß eine Totalsynthese des natürlichen Wirkstoffes mit Sicherheit wegen des Vorliegens einer mittelständigen Arginyl-methionyl-Bindung Schwierigkeiten bereiten würde. Aus diesem Grunde haben wir zunächst eine Synthese des Norleucin-13-Motilins ins Auge gefaßt aus der Überlegung heraus, daß

- a. das Norleucin-13-Dokosa-Peptid leichter zugänglich,
- b. trotz des Norleucin-Restes eine Überprüfung der Strukturermittlung raschestmöglich gewährleistet und
- c. zusätzlich die Frage der biologischen Wirksamkeits-Spezifität des Methionin-13-Restes zu klären sein sollte.

Die Totalsynthese des Norleucin-13-Motilins sah drei Etappen vor:

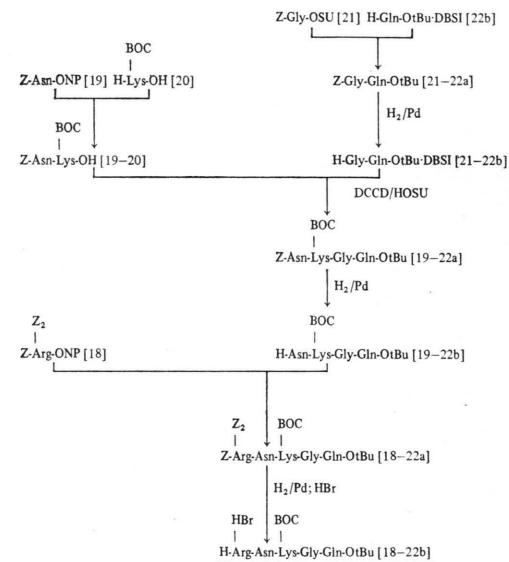
- A. Erstellung von sechs zur weiteren Verknüpfung geeigneten entsprechend geschützten Teilesequenzen, wobei alle Seitenkettenfunktionen mehrfunktioneller Aminosäuren acidolytisch leicht spaltbare Schutzgruppen auf tert. Alkohol-Basis trugen und die komplexe Funktion des Arginins teils durch N_ω, N_δ-Diacylierung teils durch Protonierung (Salzbildung mit Bromwasserstoff) maskiert wurden.
- B. Vereinigung der sechs Fragmente I-VI nach dem weitgehend racemisierungs-freien „Wünsch-Weygand-schen - Carbodiimid-N-Hydroxysuccinimid-Verfahren“⁸ bzw. dessen „Geiger-König - Modifikation“⁹ zur allseits-maskierten Gesamtsequenz 1-22, Abspaltung aller Schutzgruppen mittels Trifluoressigsäure, anschl. Entfernung der Trifluoracetat- und Bromidionen mittels Dowex 44 und Isolierung des „Roh-Norleucin-13-Motilins“.
- C. Reindarstellung des synthetischen Norleucin-13-Motilins.

A. Erstellung der Fragmente

1. Teilesequenz 18-22 (Fragment I)

H-Gln-OtBu[22b], aus Z-Gln-OH[22a] durch Veresterung mit Essigsäure-tert-butylester unter Schwefelsäure-Katalyse und folgender hydrogenolytischer Ent-

fernung der Benzyloxy-carbonyl-Schutzgruppe zugänglich, wurde mit Z-Gly-OSU[21] zum Benzyl-oxy-carbonyl-Dipeptidester[21-22a] verknüpft; der nach hydrogenolytischer Entfernung der N-Schutzgruppe erhaltene H-Gly-Gln-OtBu[21-22b] wurde mit Z-Asn-Lys(BOC)-OH[19-20] nach dem Wünsch-Weygand-schen - Verfahren zum Benzyloxycarbonyltetrapeptid-tert-butylester[19-22a] verknüpft. Die Kopfkomponente [19-20] konnte durch Aminoacylierung von H-Lys(BOC)-OH[20] mit Z-Asn-ONP[19] unter üblichen Bedingungen gewonnen werden.



Syntheseschema: Fragment I (Teilesequenz 18-22).

Entfernung der Benzyloxy-carbonyl-Schutzgruppe aus Z-Asn-Lys(BOC)-Gly-Gln-OtBu[19-22a] mittels katalytisch erregtem Wasserstoff führte zum Tetrapeptid-Ester-Derivat[19-22b], das mit Z-Arg(δ, ω -Z₂)-ONP[18] mit Erfolg zum Z-Arg(δ, ω -Z₂)-Asn-Lys(BOC)-Gly-Gln-OtBu[18-22a] vereinigt werden konnte.

Ausbeute: 55 % über alle Stufen, bezogen auf H-Gln-OtBu[22b] als Startmaterial; $[\alpha]_D^{20} = -7,6 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -9,4^\circ$ ($c = 1$ in Essigsäure); chromatographisch rein in n-Butanol/Eisessig/Wasser 3:1:1 und n-Heptan/tert-Butanol/Eisessig 5:1:1.

Analyse

Ber.: C 57,98 H 6,69 N 13,29 O 22,02,
Gef.: C 57,70 H 6,56 N 13,29 O 22,45.

Mit der katalytischen Entfernung der drei Benzyl-oxy-carbonyl-Maskierungen durch katalytische Hydrogenolyse unter Zusatz von zwei Äquivalenten

Bromwasserstoff gelangten wir zur gewünschten Fraktion I: H-Arg(HBr)-Asn-Lys(BOC)-Gly-Gln-OtBu·HBr[18-22b]. Ausbeute: 98 %; $[\alpha]^{20}_{D} = -4,8 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]^{20}_{546} = -6,05^\circ$ ($c = 1$ in 80proz. Essigsäure); chromatographisch rein in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser 3:1:1 und *tert*-Amylalkohol/Pyridin/Wasser 35:35:30.

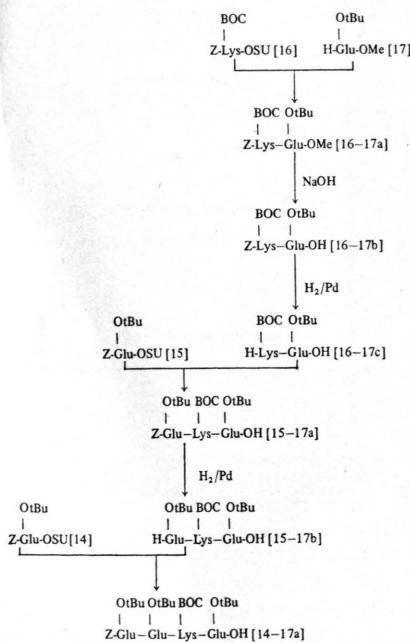
Analyse

Ber.: C 40,21 H 6,85 N 16,12 Br 16,72,
Gef.: C 40,46 H 6,93 N 15,89 Br 16,51.

2. Teilsequenz 14-17 (Fragment II)

Z-Lys(BOC)-OSU[16] und H-Glu(OtBu)-OMe[17] ließen sich erwartungsgemäß gut zum Benzyloxy-carbonyl-dipeptidester[16-17a] vereinigen; alkalische Esterverseifung und anschl. katalytische Entacylierung führte über das Dipeptid-Derivat[16-17b] zu H-Lys(BOC)-Glu(OtBu)-OH[16-17c]. In zweimaligem Stufenweisen Anbauverfahren mit Hilfe von Z-Glu(OtBu)-OSU[15 bzw. 14] als jeweilige Kopfkomponente konnte letztlich Fraktion II, d. i. Z-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Lys(BOC)-Glu(OtBu)-OH[14-17a] erhalten werden.

Ausbeute: 48 % über alle Stufen, bezogen auf H-Glu(OtBu)-OMe[17]; Schmp. = 147-149 °C; $[\alpha]^{20}_{D} = -9,0 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]^{20}_{546} = -12,3^\circ$ ($c = 1$ in Dimethylformamid); chromatographisch rein in Cyclohexan/Chloroform/Eisessig 45:45:10.



Syntheseschema: Fragment II (Teilsequenz 14-17).

Analyse

Ber.: C 59,2 H 7,86 N 7,48,
Gef.: C 58,70 H 8,04 N 7,72.

3. Teilsequenz 12-13 (Fragment III)

Die Herstellung dieses Teilstückes, d. i. Z-Arg(δ , ω -Z₂)-Nle-OH[12-13], konnte in 86proz. Ausbeute durch Aminoacylierung von Norleucin [13] mittels Z-Arg(δ , ω -Z₂)-OSU[12] bewerkstelligt werden.

Schmp. = 130-132 °C; $[\alpha]^{20}_{D} = +7,2 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]^{20}_{546} = +8,4^\circ$ ($c = 1$ in Eisessig); chromatographisch rein in *n*-Heptan/*tert*-Butanol/Eisessig 5:1:1 und *n*-Butanol/Eisessig/Wasser 3:1:1.

Analyse

Ber.: C 62,69 H 6,28 N 10,15,
Gef.: C 62,45 H 6,28 N 10,16.

4. Teilsequenz 9-11 (Fragment IV)

Im Zuge unserer Sekretin-Synthese hatten wir das Dipeptid H-Leu-Gln-OH aufgebaut¹⁰; es konnte jetzt als Sequenzbruchstück [10-11] für die Motilin-Synthese Verwendung finden. Aufknüpfung von Z-Glu(OtBu)-OSU[9] auf das Dipeptid [10-11] führte in 74-proz. Ausbeute zum Fragment IV, d. i. Z-Glu(OtBu)-Leu-Gln-OH[9-11]. Schmp. = 146-148 °C; $[\alpha]^{20}_{D} = -31,6 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]^{20}_{845} = -38,1^\circ$ ($c = 1$ in Methanol); chromatographisch rein in *n*-Heptan/*tert*-Butanol/Eisessig 5:1:1 und *n*-Butanol/Eisessig/Wasser 3:1:1.

Analyse

Ber.: C 58,12 H 7,32 N 9,68,
Gef.: C 58,05 H 7,24 N 9,48.

5. Teilsequenz 6-8 (Fragment V)

Im Zuge unserer Synthese des Leucin-15-Human-gastrins hatten wir auch das Dipeptid H-Tyr(tBu)-Gly-OH erstellt¹¹; es fand nunmehr als Dipeptid-Teilstück mit der Motilin-Sequenz 7-8 Verwendung für den Aufbau des Fragments V. Verknüpfung von H-Tyr(tBu)-Gly-OH[7-8] mit Z-Thr(tBu)-OSU[6] lieferte das Benzyloxycarbonyl-tripeptid[6-8a], das durch katalytische Entbenzyloxycarbonylierung das gewünschte Endprodukt H-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Gly-OH[6-8b] erbrachte.

< Ausbeute: ca. 81 % über beide Stufen, bezogen auf eingesetztes Dipeptid[7-8]; Schmp. = 126-127 °C; $[\alpha]^{20}_{D} = +7,9 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]^{20}_{546} = +8,9^\circ$ ($c = 1$ in Methanol); chromatographisch rein in *tert*-Amylalkohol/Pyridin/Wasser 35:35:30;

Analyse

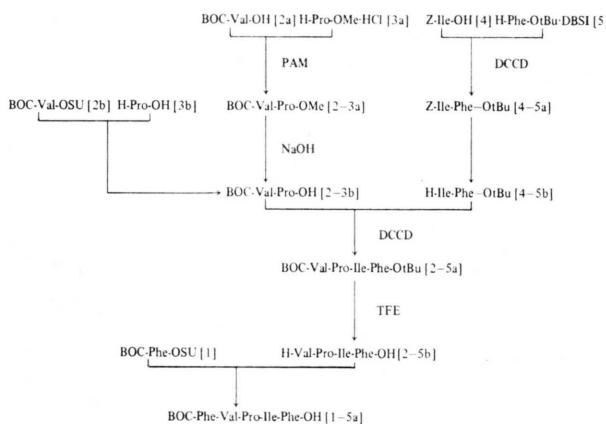
Ber.: C 60,88 H 8,30 N 8,88,
Gef.: C 60,69 H 8,31 N 8,91.

Bezogen auf ein Dipeptid mit $\frac{1}{4}$ Mol Kristall-Essigester).

6. Teilsequenz 1-5 (Fragment VI)

Carbodiimid-Verknüpfung von Z-Ile-OH[4] und H-Phe-OtBu[5] mit anschließender katalytischer Entacylierung des intermediären Benzyloxycarbonyl-Dipeptid-Esters[4-5a] ließ eine Isolierung von H-Ile-Phe-OtBu[4-5b] in über 90-proz. Ausbeute zu. Gleichzeitig wurden BOC-Val-OH[2a] und H-Pro-OMe[3a] nach der Phosphorazo-Methode zum *tert*-Butyloxycarbonyl-Dipeptid-Ester[2-3a] vereinigt; nachfolgende alkalische Esterverseifung ergab in über 70-proz. Ausbeute BOC-Val-Pro-OH[2-3b]. Einfacher und in hoher Ausbeute (83 %) verlief die Herstellung von [2-3b] durch Umsetzung von BOC-Val-OSU[2b] mit zwei Aequivalenten Prolin[3b].

Beide Dipeptid-Derivate ließen sich mit Hilfe der Carbodiimid-Methode zum BOC-Val-Pro-Ile-Phe-OtBu[2-5a] verknüpfen; Trifluoressigsäure-Einwirkung auf [2-5a] führte zum freien Tetrapeptid H-Val-Pro-Ile-Phe-OH[2-5b], an das in üblicher Manier BOC-Phe-OSU[1] zum BOC-Phe-Val-Pro-Ile-Phe-OH[1-5a] (= Fragment VI) angebaut werden konnte.



Syntheseschema: Fragment VI (Teilsequenz 1-5).

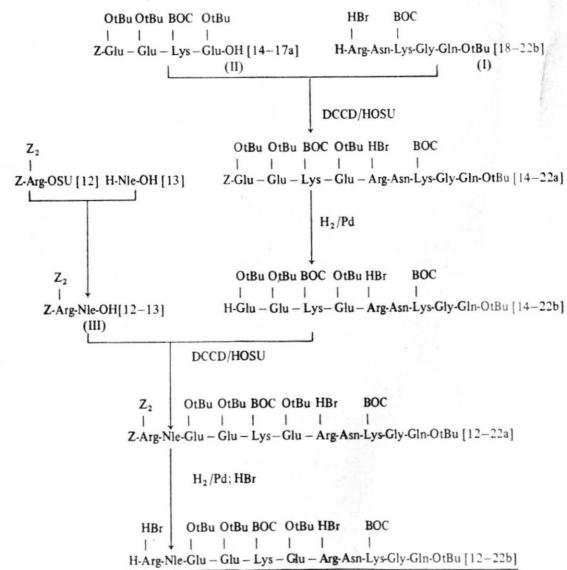
Ausbeute: 63 % über die letzten drei Stufen, bezogen auf [4-5b]; Schmp. = 218 °C; $[\alpha]^{20}_D = 64,2 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]^{20}_{546} = -75,82^\circ$ ($c = 1$ in Essigsäure); chromatographisch rein in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser 3:1:1 und *tert*-Amylalkohol/Pyridin/Wasser 35:35:30.

Analyse

Ber.: C 64,88 H 7,64 N 9,70,
Gef.: C 64,72 H 7,70 N 9,61.

B. Erstellung der Gesamtsequenz 1-22

Auf das carboxylendständige Fragment I, d. i. H-Arg(HBr)-Asn-Lys(BOC)-Gly-Gln-OtBu.HBr[18-22b], konnte unter Anwendung der Dicyclohexylcarbodiimid-N-Hydroxysuccinimid-Technik das Fragment II, d. i. Z-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Lys(BOC)-Glu(OtBu)-OH[14-17a], mit bestem Erfolg aufgeknüpft werden; der erhaltene N-Benzoyloxycarbonyl-nonapeptid-*tert*-butylester[14-22a] ließ sich durch katalytische Hydrogenolyse einwandfrei in H-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Lys(BOC)-Glu(OtBu)-Arg(HBr)-Asn-Lys(BOC)-Gly-Gln-OtBu[14-22b] überführen. Der Anbau des Fragments III, d. i. Z-Arg(δ, ω -Z₂)-Nle-OH[12-13], auf vorstehendes Nonapeptid-ester-Derivat[14-22b] gelang wiederum unter Anwendung des Wünsch-Wegmannschen-Verknüpfungs-Verfahrens eindeutig: Z-Arg(δ, ω -Z₂)-Nle-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Lys(BOC)-Glu(OtBu)-Arg(HBr)-Asn-Lys(BOC)-Gly-Gln-OtBu[12-22a] konnte in der erwünschten Reinheit isoliert werden.



Syntheseschema: Fragment III (Teilsequenz 12-13); Fragmentkondensation I+II+III zu Teilsequenz 12-22.

Ausbeute: ca. 69% über alle drei Stufen, bezogen auf eingesetztes Fragment I; $[\alpha]^{20}_D = -4,9 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]^{20}_{546} = -6,9^\circ$ ($c = 0,7$ in Methanol); chromatogra-

graphisch rein in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser 3:1:1 und *n*-Heptan/tert-Butanol/Eisessig 3:2:1.

Analyse

Ber.: C 55,48 H 7,29 N 12,82 O 20,92 Br 3,48,

Gef.: C 45,24 H 7,27 N 12,62 O 20,97 Br 3,20.

Einwirkung von katalytisch erregtem Wasserstoff

auf das Undecapeptid-Derivat [12-22a] führte zur Entfernung der drei Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppen; nach Neutralisation der freigewordenen Guanido-Funktion mit Bromwasserstoffsäure (gleichzeitig während der Hydrierung vorgenommen) konnte H-Arg(HBr)-Nle-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Lys(BOC)-Glu(OtBu)-Arg(HBr)-Asn-Lys(BOC)-Gly-Gln-OtBu[12-22b] in Form seines Hydrobromids gewonnen werden.

Aufkondensation des Fragments IV, d. i. Z-Glu(OtBu)-Leu-Gln-OH[9-11], auf den Undecapeptid-tert-butylester[12-22b] verlief nach dem Dicyclohexylcarbodiimid-N-Hydroxybenzotriazol-Verfahren erfolgreich:

Aus dem Verknüpfungsprodukt, dem Tetradecapeptid-Derivat[9-22a] konnte nach hydrogenolytischer Abspaltung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe H-Glu(OtBu)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Nle-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Lys(BOC)-Glu(OtBu)-Arg(HBr)-Asn-Lys(BOC)-Gly-Gln-OtBu[9-22b], wiederum in Form des Hydrobromids und als Tetrahydrat rein isoliert werden.

Ausbeute über beide Stufen 77 %; $[\alpha]^{20}_D = -6,3 \pm 1^\circ$ bzw. $[\alpha]^{20}_{546} = -8,3^\circ$ ($c = 0,7$ in Methanol); chromatographisch rein in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser 3:1:1.

Analyse

Ber.: C 47,99 H 7,58 N 13,72,

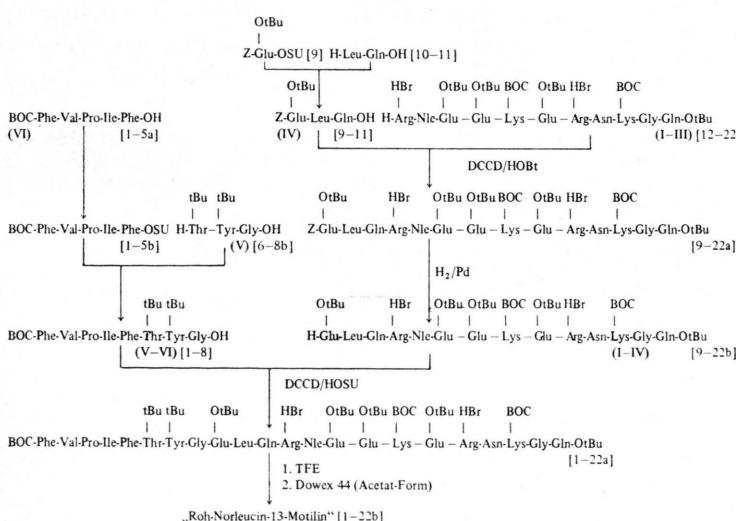
Gef.: C 47,81 H 7,28 N 13,69.

Aminosäure-Analyse: Lys 1,99 Arg 1,98 Asp 1,03

Glu 6,30 Gly 0,98 Leu 0,97 Nle 1,01.

Während des Ablaufs vorstehend beschriebener Teilstück-Kondensationen wurden die Fragmente V, d. i. H-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Gly-OH[6-8b], und VI, d. i. BOC-Phe-Val-Pro-Ile-Phe-OH[1-5a], nach dessen Überführung in den (N-Hydroxysuccinimid)-ester [1-5b] vereinigt; es gelang jedoch nicht, dieses Teilstück, d. i. BOC-Phe-Val-Pro-Ile-Phe-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Gly-OH[1-8] rein zu gewinnen. Aufgrund der Aminosäureanalyse-Werte war das Octapeptid-Derivat mit ca. 10 % [1-5a oder b] verunreinigt; alle Versuche einer Auftrennung dieses Gemisches verliefen ohne Erfolg.

Das oben erhaltene „Rohprodukt“ [1-8] (= Fragment V und VI) wurde letztlich mit dem Tetradecapeptid-Derivat[9-22b] (= Fraktion I-IV) wiederum nach dem Wünsch-Weygandschen-Verfahren zum BOC-Phe-Val-Pro-Ile-Phe-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Gly-Glu(OtBu)-Leu-Gln-Arg(HBr)-Nle-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Lys(BOC)-Glu(OtBu)-Arg(HBr)-Asn-Lys(BOC)-Gly-Gln-OtBu[1-22a] verknüpft; nach Abspaltung aller Schutzgruppen mittels wasserfreier Trifluoressigsäure und anschließendem Austausch der Trifluoracetat- und Bromid-ionen durch Ionenaustauschchromatographie an Dowex 44 (Acetat-Form) wurde ein „Roh-Norleucin-13-Motilin“ [1-22b] erhalten, das aufgrund des Einsatzes von „unreinem“ Teilstück [1-8] mit einer „Fehl-Sequenz“ behaftet sein mußte.



Syntheseschema: Fragment IV (Teilsequenz 9-11); Fragmentkondensation IV+(I-III), VI+V, (I-IV)+(V-VI).

C. Reindarstellung des synthetischen Hormons

In Anlehnung an die mit bestem Erfolg durchgeführte Reinigung von natürlichem Motilin^{2,3} wurde eine Ionenaustausch-Chromatographie von 25 mg des oben erhaltenen Roh-Norleucin-13-Motilins (Mo A) an QAE-Sephadex A-25 ausgeführt. Es resultierte eine Aufspaltung in zwei Hauptfraktionen (s. Abb. 1).

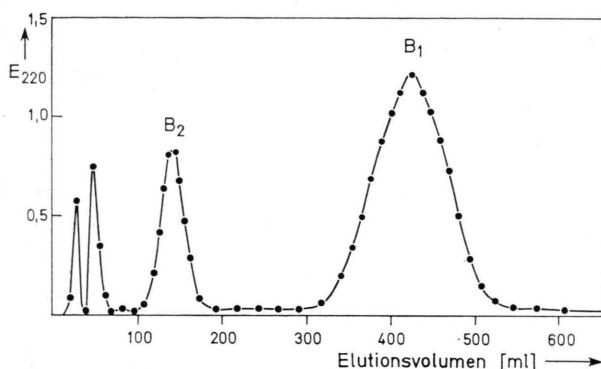


Abb. 1 Ionenaustausch-Chromatographie von rohem Norleucin-13-Motilin an QAE-Sephadex A-25; Elutionskurve. Säule: 30 x 0,9 cm; 25 mg Rohprodukt Mo-A gelöst in 2 ml 0,5-proz. Ammoniak; Elutionsmittel: 0,025 M Ammoniumacetat-Lösung (mit verd. Ammoniak auf pH 9,27 eingesetzt); Durchflußgeschwindigkeit: 18 ml/Stde.; 6 ml Fraktionen.

Die Fraktion Mo-B₂ (ca. 4 mg) entpuppte sich als die erwartete Fehlsequenz [1-5/9-22], Mo-B₁ (ca. 12 mg) als das gesuchte Norleucin-13-Motilin. Das durch Gefriertrocknung in fester Form erhaltene Dodekapeptid zeigte sich chromatographisch einheitlich im System *n*-Butanol/Eisessig/Wasser/Pyridin 30:6:24:20 und *n*-Butanol/Eisessig/Wasser/Pyridin 30:12:24:20, sowohl nach dem Verfahren der Papier-(What-

¹ V. MUTT, Acta chem. Scand. **13**, 1247 [1959].

² J. C. BROWN, V. MUTT u. J. R. DRYBURGH, Canad. J. Physiol. Pharm. **49**, 399 [1971].

³ J. C. BROWN, M. A. COOK u. J. R. DRYBURGH, Gastroenterology **62**, 401 [1972].

⁴ J. C. BROWN, M. A. COOK u. J. R. DRYBURGH, Canad. J. Biochem. im Druck.

⁵ J. C. BROWN u. J. R. DRYBURGH, Canad. J. Biochem. im Druck.

⁶ C. J. BRUTON u. B. S. HARTLEY, J. Med. Biol. **52** 165 [1970].

man Nr. 1) und Dünnschichtchromatographie (Kieselgel G).

Aminosäureanalysen der Fraktionen Mo-B₁ und Mo-B₂ (s. Tab. I).

Tab. I. Aminosäureanalysen nach saurer Hydrolyse (6 N Salzsäure; 20 Stdn.*).

	Fraktion Mo-B ₁	Fraktion Mo-B ₂	Ber. Verh. für [Nle ¹³]-Motilin
Lys	1,98	2,04	2
Arg	1,98	1,99	2
Asp	1,00	1,01	1
Thr	1,00	—	1
Glu	6,08	6,00	6
Pro	0,97	0,91	1
Gly	1,99	1,06	2
Val	0,94	0,88	1
Ile	0,95	0,86	1
Leu	1,00	0,99	1
Nle	1,01	1,00	1
Tyr	0,91	—	1
Phe	1,82	1,73	2

* Bei 72 Stdn. Hydrolysezeit wurde keine wesentliche Veränderung der Werte beobachtet.

Die biologische Aktivität der gefriergetrockneten Fraktion Mo-B₁ haben wir im orientierenden Versuch mit mindestens 50 % gefunden.

Durch eine weitere Ionenaustauschchromatographie der Fraktion Mo-B₁ an SP-Sephadex C-25 konnte eine Auftrennung in zwei Produkte Mo-C₁ und Mo-C₂ erreicht werden. Mo-C₁ zeigte eine Aktivität von über 90 % im Vergleich mit natürlichem Hormon; die Fraktion Mo-C₂ war biologisch inaktiv.

Auch vorgenommene enzymatische Abbau-Versuche erbrachten eine weitgehende Bestätigung der vorgeschlagenen Primärstruktur (mit Ausnahme des Norleucin-beeinflußten Sequenz-Bereiches).

⁷ R. E. OFFORD, Nature [London] **211**, 591 [1966].

⁸ E. WÜNSCH u. F. DREES, Ber. **99**, 110 [1966]. F. WEYGAND, D. HOFFMANN u. E. WÜNSCH, Z. Naturforsch. **21b**, 426 [1966].

⁹ W. KÖNIG u. R. GEIGER, Ber. **103**, 788 [1970].

¹⁰ E. WÜNSCH, G. WENDLBERGER u. A. HÖGEL, Ber., **104**, 2430 [1971].

¹¹ E. WÜNSCH u. K.-H. DEIMER, Z. physiol. Chem. **353**, 1246 [1972].