

Zur Totalsynthese des Human-Big-Gastrins I und seines 32-Leucin-Analogons (Vorläufige Mitteilung)

Total Synthesis of Human Big Gastrin I and the 32-Leucine Analogue
(Preliminary Communication)

E. Wünsch, G. Wendlberger, A. Hallett, E. Jaeger, S. Knof, L. Moroder, R. Scharf,
I. Schmidt, P. Thamm und L. Wilschowitz

Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung für Peptidchemie, München

(Z. Naturforsch. **32 c**, 495–506 [1977]; eingegangen am 14. März 1977)

Herrn Prof. Dr. Leonidas Zervas, em. Ordinarius für organische Chemie der Universität Athen, zu seinem 75. Geburtstag in Würdigung seiner großen Verdienste um die Peptidsynthese gewidmet

Synthetic Peptide Hormones, Human Big Gastrin I

A new total synthesis of the tetratriacontapeptide amide corresponding to the proposed primary structure of human big gastrin I is described. The synthetic route was based on the preparation of six suitably protected fragments, related to sequence 28–34, 23–27, 21–22, 15–20, 9–14, and 1–8, to be used as building blocks for the total synthesis. The protecting groups were selected according to the Schwyzer-Wünsch strategy of maximum side chain protection based on tertiary alcohols, also for the imidazol function of histidine. Subsequent assembly of the six fragments by three different pathways using the highly efficient Wünsch-Weygand condensation procedure to ensure minimum racemization, followed by deprotection of the synthetic products via exposure to trifluoroacetic acid and final purification by ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-25 and partition chromatography on Sephadex G-25, led to human big gastrin I, homogeneous within the limits of the analytical methods used. The biological activity of the synthetic product proved to be 50 percent higher than that of human little gastrin I. The 32-leucine analogue of human big gastrin I was prepared in the same way.

Die Isolierung von natürlichem Human-Big-Gastrin I in reiner Form aus Zollinger-Ellinson-Tumoren gelang R. A. Gregory und H. J. Tracy¹; gemeinsam mit G. W. Kenner und R. A. Gregory konnten J. I. Harris und M. Runswick die Primärstruktur dieses Peptid-Wirkstoffes als lineares Polypeptid mit 34 Aminosäure-Resten in der Kette aufklären, wobei die C-terminal stehenden 17 Aminosäurereste die Sequenz des Human-Gastrins I darstellen²:

H-Pyr-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-His-Pro-Ser-Leu-Val-Ala-Asp-Pro-Ser-Lys-Lys-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂.

Für die Abkürzungen der Aminosäuren und Schutzgruppen sowie für die Bezeichnung der Peptid-Analoga siehe Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, **Bd. XV**, Synthese von Peptiden (Herausg. E. Wünsch), Teil 1, S. 1–27, Georg-Thieme-Verlag Stuttgart, 1974.

Sonderdruckerfordernungen an Prof. Dr. E. Wünsch, Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung für Peptidchemie, D-8033 Martinsried bei München.

Eine 1. Totalsynthese dieses Human-Big-Gastrins I wurde von uns gemeinsam mit G. W. Kenner und seinen Mitarbeitern beschritten, wobei uns die Synthese eines C-terminalen Teils der Sequenz 20–34 zufiel. Dieses „Münchener-Fragment“ wurde dann von G. M. Kenner mit einem „Liverpooler-Fragment“ der Sequenz 1–19 zur Gesamtsequenz vereinigt^{3–5}. Gleichzeitig wurde in unseren Laboratorien aber auch eine komplette Totalsynthese angestrebt.

Unter Verwendung unserer Erfahrungen bei der Glucagon-⁶ und 15-Leucin-Human-Gastrin-I-Synthese⁷ haben wir unter Befolgung der „Schwyzer-Wünsch-Strategie“ die Totalsynthese von Human-Big-Gastrin I meistern können in drei Etappen:

A. Erstellung von sechs zur weiteren Verknüpfung geeigneten Fragmenten, wobei die Seitenkettenfunktionen wie üblich mit Schutzgruppen auf *tert*-Alkohol-Basis, d. h. Hydroxyl-Funktionen als *tert*-Butyläther, Carboxyl-Gruppen als *tert*-Butylester, Amino-Gruppen als *tert*-Butyloxycarbonyl- und Imidazol-



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 digitalized 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.

Funktionen als Adamantylloxycarbonyl-Derivate versehen waren.

B. Verknüpfung dieser sechs Fragmente auf drei verschiedenen Routen nach dem weitgehend racemisierungsfreien Wünsch-Weygandschen Verfahren⁸ zur allseits maskierten Gesamtsequenz 1–34 und Isolierung des Rohproduktes.

C. Reindarstellung des synthetischen Human-Big-Gastrins I.

A. Erstellung der Fragmente

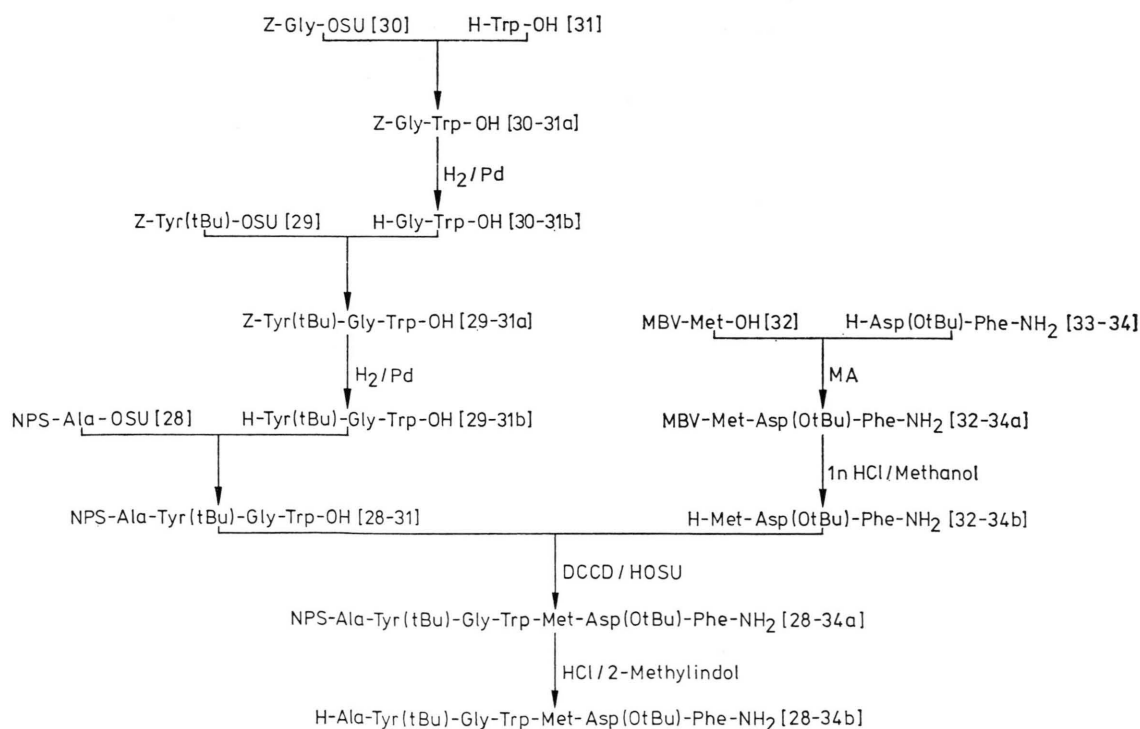
1. Teilsequenz 28–34 (Fragment I) (s. Schema 1)

H-Asp(OtBu)-Phe-NH₂ [33–34], in Form des Hydrochlorids ein Zwischenprodukt unserer 15-Leucin-Human-Gastrin-I-Synthese und daraus freigesetzt, wurde mit MBV-Met-OH [32] via Alkylkohlen säure-Mischanhydrid-Verfahren zum Tripeptid-Derivat [32–35a] aufgestockt. Die „Dane-N-Schutzgruppe“ wurde mit *n*-HCl entfernt und H-Met-Asp(OtBu)-Phe-NH₂ [32–34b] in 72-prozentiger Ausbeute isoliert.

Gleichzeitig wurde in „stufenweisem Anbauverfahren“ ausgehend von H-Trp-OH [31], Z-Gly-OSU [30], Z-Tyr(tBu)-OSU [29] und NPS-Ala-OSU [28] – unter „Zwischen-Isolierung“ der Peptid-Derivate [30–31a] und [29–31a] und, nach hydrogenolytischer Entfernung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppen, der „freien“ Peptide [30–31b] und [29–31b] – NPS-Ala-Tyr(tBu)-Gly-Trp-OH [28–31a] synthetisiert (Ausbeute ~56% über alle Stufen).

Die Verknüpfung der beiden Teilstücke [28–31a] und [32–34b] mittels Dicyclohexylcarbodiimid–N-Hydroxysuccinimid nach „Wünsch-Weygand“ verlief ebenso eindeutig wie die anschließende Desulfonylierung des erhaltenen Heptapeptidamid-Derivates [28–34a] mit Chlorwasserstoff/2-Methylindol in indifferenten Lösungsmitteln zu H-Ala-Tyr(tBu)-Gly-Trp-Met-Asp(OtBu)-Phe-NH₂ [28–34b], isoliert als Monohydrochlorid. Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 3:1:1.

$[\alpha]_D^{20} = -77,5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -92,8^\circ$ ($c = 1$ in Dimethylformamid).



Schema 1: Teilsequenz 28–34 (Fragment I)

Ausbeute: 90% über beide Stufen.

Analyse für $C_{51}H_{70}N_9O_{10}$ S Cl (1036,7) :

Ber.: C 59,09 H 6,81 N 12,16 S 3,09 Cl 3,42;

Gef.: C 59,00 H 6,97 N 12,01 S 3,04 Cl 3,45.

Aminosäure-Analyse: Ala 1,01, Tyr 1,01, Gly 0,99,

Met 0,98, Trp —, Asp 0,98, Phe 1,00.

2. Teilsequenz 23 – 27 (Fragment II) (s. Schema 2)

Auf H-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-OH [26 – 27c] — in ca. 74-prozentiger Ausbeute zugänglich durch Verknüpfung von H-Glu(OtBu)-OMe [27] und Z-Glu(OtBu)-OSU [26] zu Z-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-OMe [26 – 27a], folgende alkalische Verseifung zum Benzyloxycarbonyl-Dipeptid-Derivat [26 – 27b] und dessen übliche hydrogenolytische Entacylierung — wurden dreimal Z-Glu(OtBu)-OSU [d. h.

25, 24 und 23] in bekannter „Synthese-Manier“, d. h. jeweils Vereinigung zum Acylpeptid und anschließende Entfernung der N-Schutzgruppe, aufgestockt. Das so isolierte „freie“ Pentapeptid-Derivat

H-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-OH [23 – 27b]

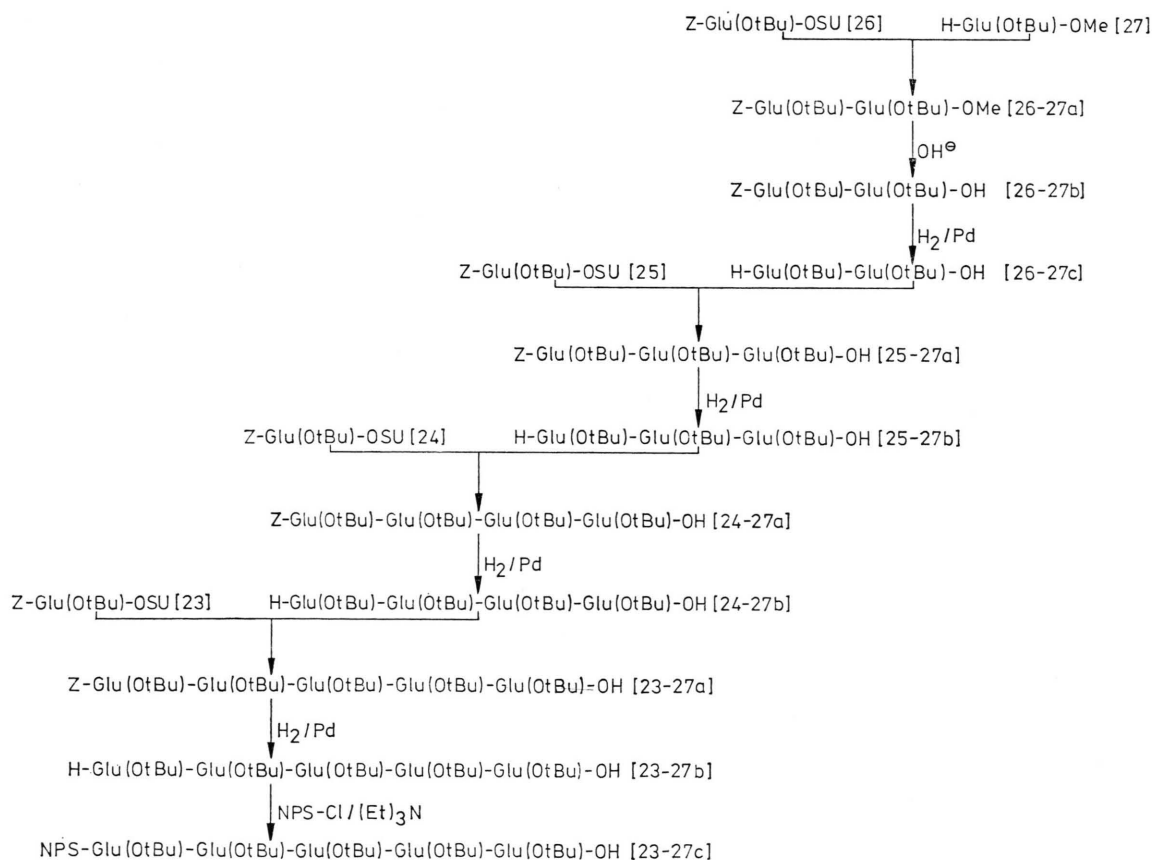
war chromatographisch einheitlich in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 3:1:1; *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin 60:6:24:20; *n*-Heptan/*tert*-Butanol/Essigsäure 3:2:1 und Chloroform/Methanol 9:1. Schmelzpunkt 194 – 195 °C; $[\alpha]_D^{20} = -7,2^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -8,2^\circ$ ($c = 1$ in 80-prozentiger Essigsäure).

Ausbeute: ca. 65% über alle Stufen.

Analyse für $C_{45}H_{77}N_5O_{16}$ (944,1) :

Ber.: C 57,25 H 8,22 N 7,42;

Gef.: C 57,19 H 8,27 N 7,43.



Schema 2 : Teilsequenz 23 – 27 (Fragment II)

Anschließende Acylierung von [23 – 27b] mit 2-Nitrophenylsulfenylchlorid in Dimethylformamid unter Triäthylamin-Zusatz erbrachte das gewünschte Fragment II, d. i. NPS-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-OH [23 – 27c], chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin 60:6:24:20, Cyclohexan/Chloroform/Essigsäure 45:45:10 und *n*-Heptan/*tert*-Butanol/Pyridin 2:1:1. Schmelzpunkt 160 – 162 °C; $[\alpha]_D^{20} = -16,8^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -15,6^\circ$ ($c = 1$ in Dimethylformamid). Ausbeute: 77%.

Analyse für $C_{51}H_{80}N_6O_{18}S$ (1097,3):

Ber.: C 55,82 H 7,35 N 7,66 S 2,92;
Gef.: C 55,85 H 7,39 N 7,65 S 2,89.

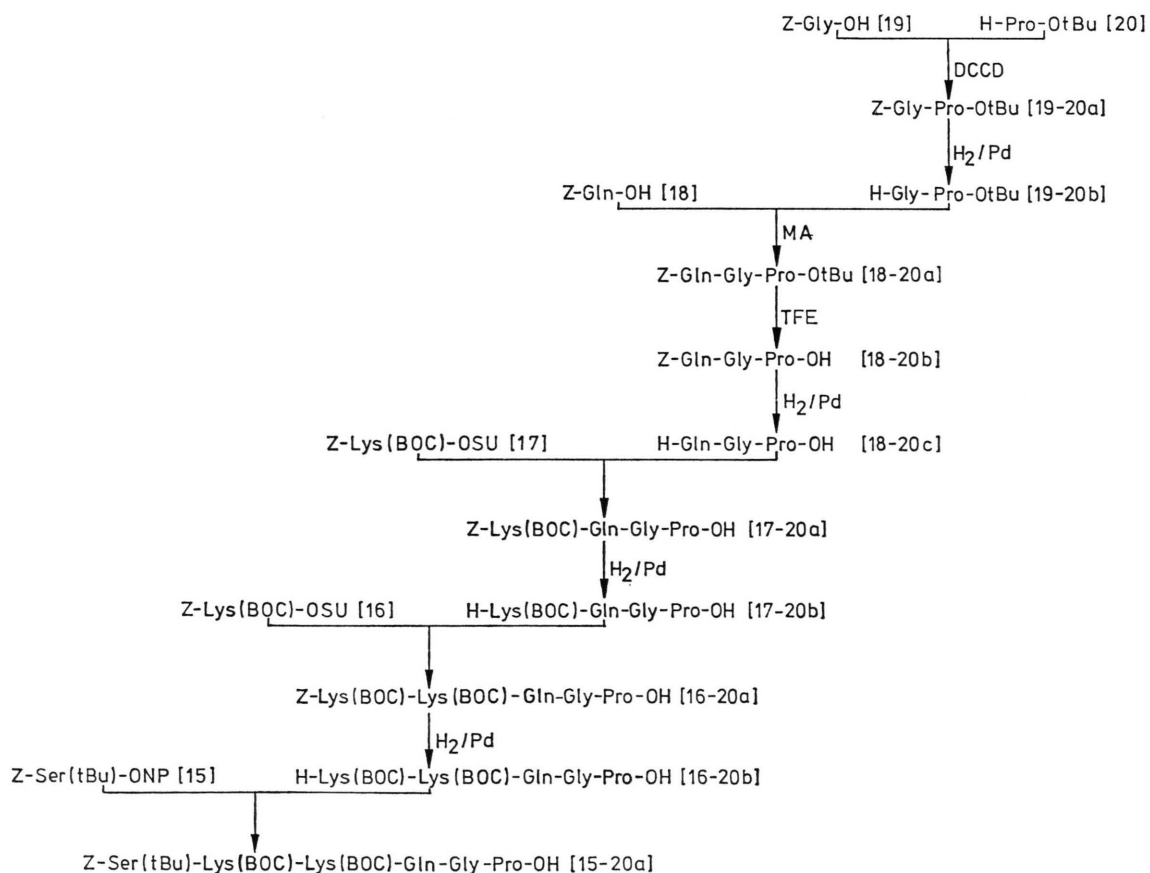
3. Teilsequenz 21 – 22 (Fragment III)

H-Trp-Leu-OH [21 – 22b] wurde aus Z-Trp-OSU [21] und Leucin [22] via Intermediärprodukt

Z-Trp-Leu-OH [21 – 22a] auf dem gleichen Wege erhalten, der für das Dipeptid als Zwischenprodukt unserer 15-Leucin-Human-Gastrin-I-Synthese früher beschrieben worden war.

4. Teilsequenz 15 – 20 (Fragment IV) (s. Schema 3)

H-Gly-Pro-OtBu [19 – 20b] – durch hydrogenolytische Entacylierung von Z-Gly-Pro-OtBu [19 – 20a] zugänglich – wurde mit Z-Gln-OH [18] nach dem „Pivalinsäure-Mischanhydrid-Verfahren“ zum stark wasserlöslichen Tripeptid-Derivat Z-Gln-Gly-Pro-OtBu [18 – 20a] verknüpft; nach aufeinanderfolgenden üblichen Spaltungen der *tert*-Butylester- und Benzylurethan-Gruppierungen konnte das Tripeptid H-Gln-Gly-Pro-OH [18 – 20c] analytisch rein in 67-prozentiger Ausbeute (bezogen auf [19 – 20a]) isoliert werden. Die Aufstockung der weiteren drei Aminosäure-Reste in „Sequenz-Folge“ auf H-Gln-



Schema 3: Teilsequenz 15 – 20 (Fragment IV)

Gly-Pro-OH [18–20c] verlief unter Einsatz von ($2 \times$) Z-Lys(BOC)-OSU [17 bzw. 16] zu den Peptid-Derivaten [17–20a] bzw. [16–20a] mit jeweils folgender hydrogenolytischer Entfernung der N_α -Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe zum freien, nur „seitenketten-blockierten“ Tetrapeptid [17–20b] bzw. Pentapeptid [16–20b] und letztlich von Z-Ser(tBu)-ONP [15] zum gewünschten verknüpfungsfähigen Fragment IV, d. i.

Z-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Lys(BOC)-Gln-Gly-Pro-OH [15–20a].

Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 3:1:1, *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin 60:6:24:20.

$[\alpha]_D^{20} = -29,2^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -35,3^\circ$ ($c = 1$ in Dimethylformamid).

Ausbeute: ca. 51% über die letzten 5 Stufen.

Analyse für $C_{49}H_{79}N_9O_{15}$ (1034,2):

Ber.: C 56,91 H 7,70 N 12,19;

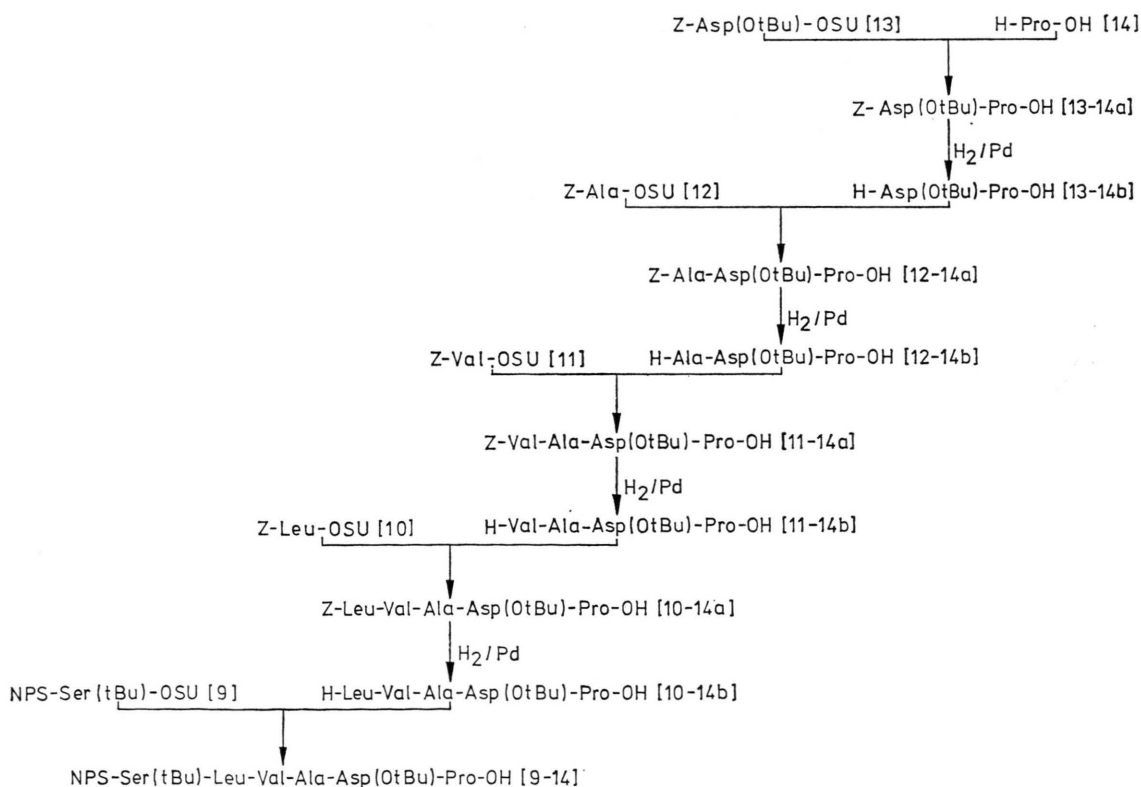
Gef.: C 56,63 H 8,03 N 12,12.

Aminosäure-Analyse: Ser 1,03, Lys 1,95, Glu 1,00, Gly 1,00, Pro 0,99.

5. Teilsequenz 9–14 (Fragment V) (s. Schema 4)

Die Aminoacylierung von Prolin [14] mit Z-Asp(OtBu)-OSU [13] führte zu Z-Asp(OtBu)-Pro-OH [13–14a], isoliert als Dicyclohexylammonium-Salz. Die folgende Entfernung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe gelang auf üblichem Wege zwar einwandfrei, doch bei der „Aufarbeitung des Hydrieransatzes“ wurde eine anscheinend sehr leicht eintretende Dioxopiperazin-Cyclisierung beobachtet. Das cyclische Nebenprodukt kann durch Gelchromatographie an Sephadex LH-20 abgetrennt werden; für die weitere Umsetzung ist jedoch eine Reindarstellung von H-Asp(OtBu)-Pro-OH [13–14b] nicht erforderlich.

In stufenweisem Verfahren wurden auf vorgeanntes ca. 95% reines H-Asp(OtBu)-Pro-OH [13–14b] die vier Aktivester-Derivate Z-Ala-OSU [12], Z-Val-OSU [11], Z-Leu-OSU [10] und NPS-



Schema 4: Teilsequenz 9–14 (Fragment V)

Ser(tBu)-OSU [9] angebaut – unter „Zwischen-Isolierung“ der Peptid-Derivate [12–14a], [11–14a] und [10–14a] sowie nach hydrogenolytischer Entfernung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppen dann der „freien“ Peptide [12–14b], [11–14b] und [10–14b] – und letztlich das Fragment V, d. i. NPS-Ser(tBu)-Leu-Val-Ala-Asp(OtBu)-Pro-OH [9–14], erhalten. Chromatographisch rein in *n*-Heptan/*tert*-Butanol/Essigsäure 3:2:1.

$[\alpha]_D^{20} = -48,5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -51,8^\circ$ ($c = 1$ in Dimethylformamid).

Ausbeute: 25% über alle Stufen.

Analyse für $C_{40}H_{63}N_7O_{12}S \cdot 1/2 H_2O$ (875,1):

Ber.: C 54,90 H 7,37 N 11,20 S 3,66;

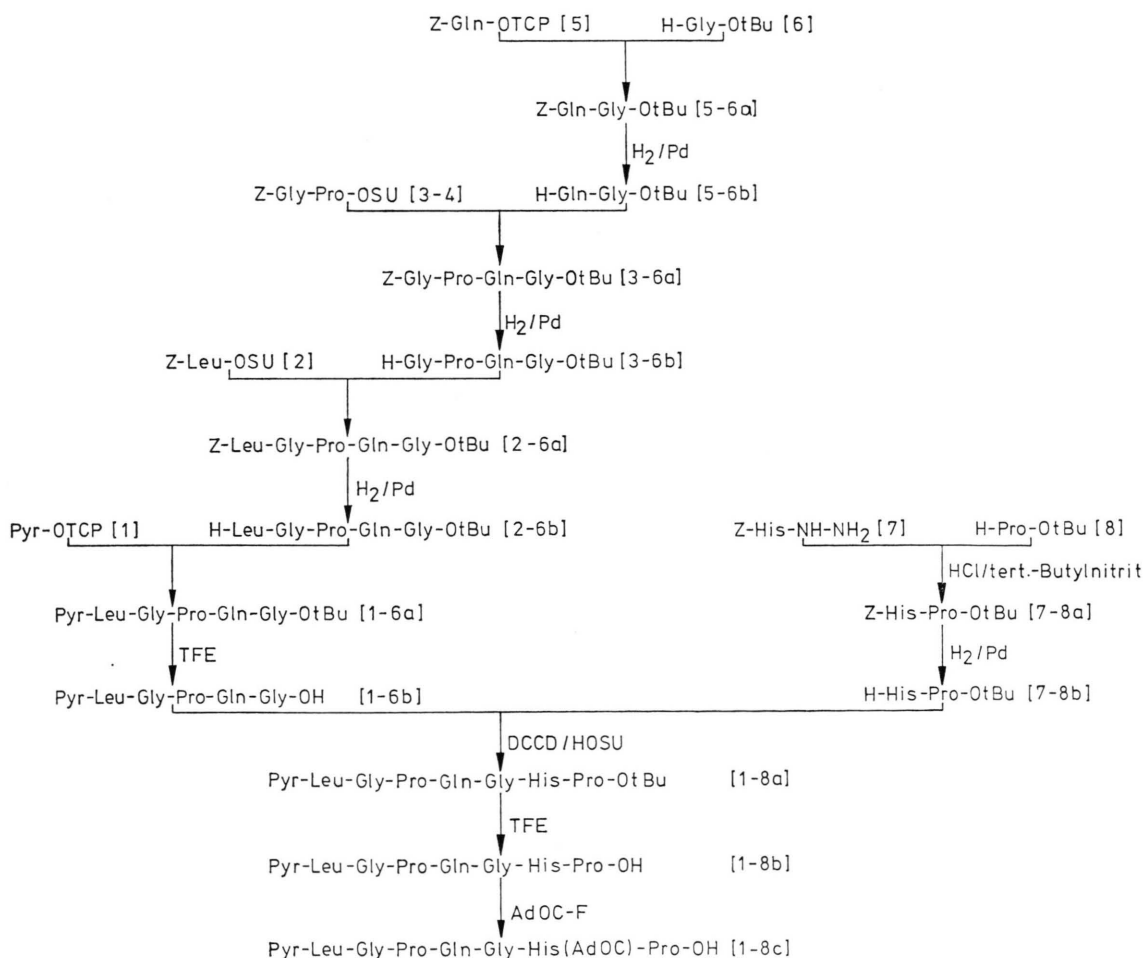
Gef.: C 54,84 H 7,40 N 11,24 S 3,73.

Aminosäure-Analyse: Ser 1,02, Leu 0,98, Val 0,97, Ala 1,00, Asp 1,01, Pro 1,04.

6. Teilsequenz 1–8 (Fragment VI) (s. Schema 5)

Weitgehend den Versuchen von Kenner *et al.*⁹ folgend, wurde die Teilsequenz 1–6 wie folgt aufgebaut: H-Gly-OtBu [6] ließ sich mit Z-Gln-OTCP [5] gut zum geschützten Dipeptid-Derivat [5–6a] vereinigen; nach hydrogenolytischer Entfernung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe wurde der resultierende H-Gln-Gly-OtBu [5–6b] sofort mit Z-Gly-Pro-OSU [3–4] zum Tetrapeptid-Derivat [3–6a] verknüpft.

Nach erneuter hydrogenolytischer Freisetzung der Aminofunktion zu H-Gly-Pro-Gln-Gly-OtBu [3–6b] geschah die Aufstockung der restlichen Sequenzposi-



Schema 5: Teilsequenz 1–8 (Fragment VI)

tionen 2 bzw. 1 mittels Z-Leu-OSU [2] bzw. H-Pyr-OTPC – über die Zwischenprodukte [2–6a] und [2–6b] – zum Teilstück H-Pyr-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-OtBu [1–6a].

Gleichzeitig wurde Z-His-Pro-OtBu [7–8a] nach dem von Rudinger modifizierten Azid-Verfahren aus dem hierfür üblichen Ausgangsmaterialien Z-His-NH-NH₂ [7] und H-Pro-OtBu [8] gewonnen; nach hydrogenolytischer Entfernung des Benzyloxycarbonyl-Restes konnte H-His-Pro-OtBu [7–8b] in Form des 4-Toluol-sulfonats isoliert werden (Ausbeute über beide Stufen: >84%).

Dieses Dipeptid-Derivat [7–8b] wurde nunmehr mit H-Pyr-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-OH [1–6b] – erhalten aus der Hexapeptid-*tert*-Butylester-Verbindung [1–6a] durch acidolytische Esterspaltung – nach dem „Hydrosuccinimid-Ester“-Verfahren zu H-Pyr-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-His-Pro-OtBu [1–8a] vereinigt. Nach Trifluoressigsäure-Spaltung der *tert*-Butylester-Gruppierung konnte das freie Oktapeptid-Trifluoracetat [1–8b] erhalten werden; zwecks späterer „imidazol-ungestörter“ Fragmentverknüpfung wurde die N_{im}-Funktion des Histidins durch

Acylierung mit Adamantylloxycarbonyl-Fluorid¹¹ maskiert und H-Pyr-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-His(AdOC)-Pro-OH [1–8c] als kristallisiertes Monohydrat isoliert. Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 3:1:1.

Schmelzpunkt: 183 °C (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -42,5^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -50,5^\circ$ ($c = 1$ in Dimethylformamid).

Ausbeute: ~13% über alle Stufen.

Analyse für C₄₇H₆₇N₁₁O₁₃·H₂O (1012,16):

Ber.: C 55,77 H 6,87 N 15,22;

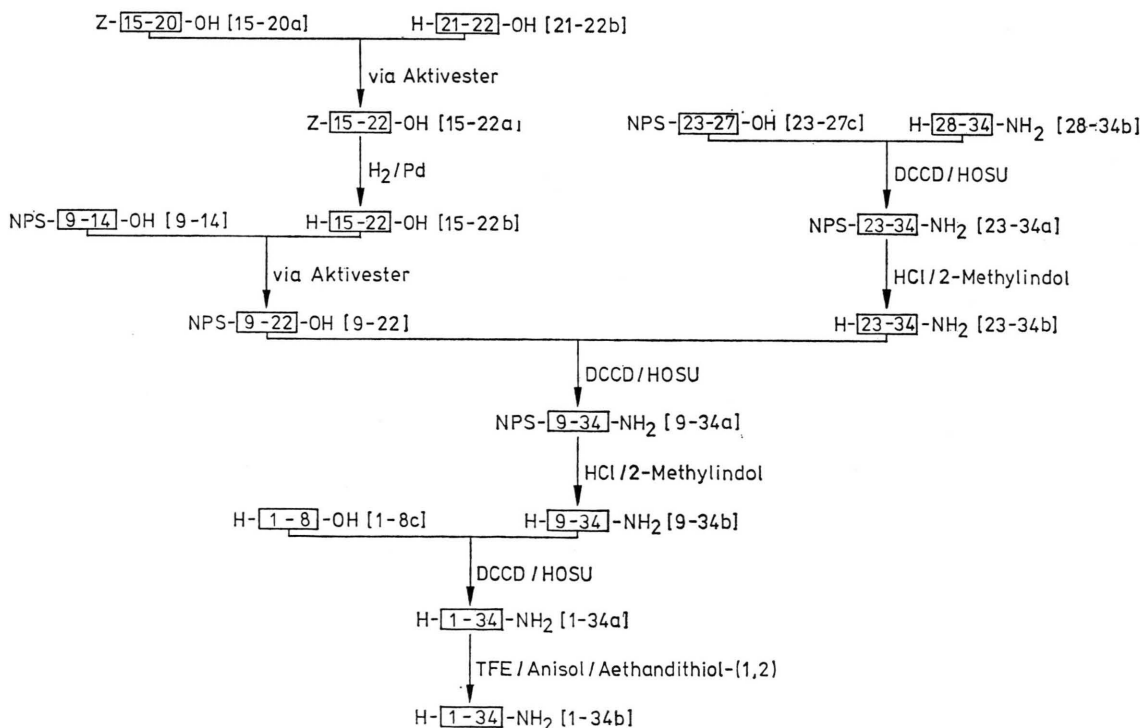
Gef.: C 55,80 H 6,83 N 15,05.

Aminosäure-Analyse: Glu 2,00, Leu 0,98, Gly 1,95, Pro 2,06, His 0,98.

B. Verknüpfung der Fragmente

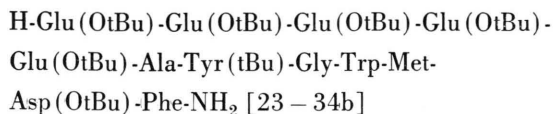
1. Erstellung der Gesamtsequenz 1–34 nach Weg A (s. Schema 6)

Die Vereinigung der Fragmente I und II, d. s. H-Ala-Tyr(tBu)-Gly-Trp-Met-Asp(OtBu)Phe-NH₂ [28–34b] und NPS-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-OH [23–27c]



Schema 6: Gesamtsequenz 1–34, Weg A

zum allseits geschützten Sequenzteilstück I – II [23 – 34a] ließ sich nach dem Wünsch-Weygandschen Carbodiimid-Hydroxysuccinimid-Verfahren bewerkstelligen; für die anschließende Entfernung der 2-Nitrophenylsulfonyl-Schutzgruppe von [23 – 34a] erwies sich die Einwirkung von Chlorwasserstoff/2-Methylindol in Trifluoräthanol als Methode der Wahl:



konnte in Form des Hydrochlorids fast quantitativ isoliert werden. Chromatographisch rein in Chloroform/Trifluoräthanol 3:1 bzw. 3:2.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +10,6^\circ \text{ bzw. } [\alpha]_{546}^{20} = +12,6^\circ \quad (c = 0,5 \text{ in Trifluoräthanol}).$$

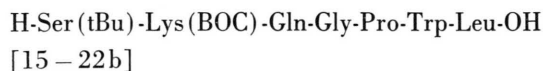
Ausbeute: ca. 85% über beide Stufen.

Analyse für $\text{C}_{96}\text{H}_{145}\text{N}_{14}\text{O}_{25}\text{S}\text{Cl}$ (1962,8):

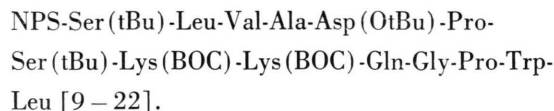
$$\begin{aligned} \text{Ber.: } &\text{C } 58,75 \quad \text{H } 7,45 \quad \text{N } 9,99 \quad \text{S } 1,63 \quad \text{Cl } 1,80; \\ \text{Gef.: } &\text{C } 58,45 \quad \text{H } 7,51 \quad \text{N } 9,91 \quad \text{S } 1,74 \quad \text{Cl } 1,89. \end{aligned}$$

Aminosäure-Analyse: Glu 5,02, Ala 1,00, Tyr 1,00, Gly 1,00, Trp –, Met 0,98, Asp 1,02, Phe 0,98.

Gleichzeitig wurden die Fragmente III und IV, d. s. H-Trp-Leu-OH [21 – 22b] und Z-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Lys(BOC)-Gln-Gly-Pro-OH [15 – 20a] nach dem „Hydroxysuccinimid-Ester“-Verfahren zum Oktapeptid-Derivat [15 – 22a] verknüpft, dessen quantitative hydrogenolytische Entacylierung zu



gelang. An dieses Teilstück wurde dann Fragment V, d. i. NPS-Ser(tBu)-Leu-Val-Ala-Asp(OtBu)Pro-OH [9 – 14], ebenfalls nach dem Aktivester-Verfahren angebaut zum Sequenzteilstück III – V, d. i.



Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 3:1:1, *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin 60:6:24:20 und Chloroform/Methanol 3:1. Schmelzpunkt: 216 – 218 °C (Zers.); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -40,4^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -45,8^\circ$ ($c = 1$ in Dimethylformamid).

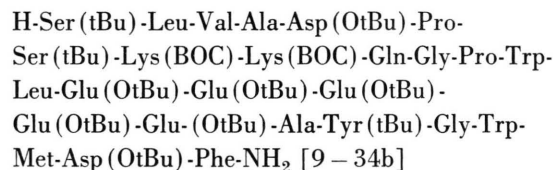
Ausbeute: 66% über drei Stufen.

Analyse für $\text{C}_{98}\text{H}_{155}\text{N}_{19}\text{O}_{26}\text{S}$ (2047,51):

$$\begin{aligned} \text{Ber.: } &\text{C } 57,49 \quad \text{H } 7,63 \quad \text{N } 13,00; \\ \text{Gef.: } &\text{C } 57,60 \quad \text{H } 7,52 \quad \text{N } 12,84. \end{aligned}$$

Aminosäure-Analyse: Ser 2,02, Leu 1,96, Val 0,96, Ala 1,00, Asp 1,03, Pro 2,00, Lys 1,95, Glu 1,02, Gly 0,98, Trp 0,99.

Die Vereinigung der Sequenzteilstücke I – II [23 – 34b] und III – V [9 – 22] zum Hexakosapeptidamid-Derivat, d. i. [9 – 34a] konnte wieder einmal nach dem bewährten Wünsch-Weygand-Verfahren vollzogen werden; ein reines Material wurde in ca. 67,5-prozentiger Ausbeute nach Gelchromatographie an Sephadex LH-20 (Elutionsmittel: Dimethylformamid) gewonnen. Chlorwasserstoff/2-Methylindol-Spaltung der Sulfenamid-Bindung von [9 – 34a] erbrachte



isoliert in Form des Hydrochlorids.

Chromatographisch rein in Chloroform/Trifluoräthanol 3:1; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -15,1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -18,5^\circ$ ($c = 0,5$ in Dimethylformamid).

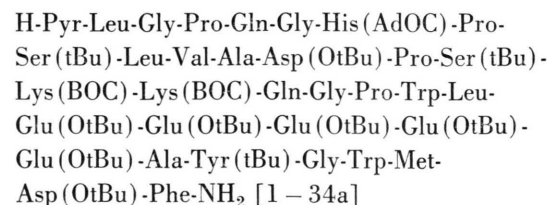
Ausbeute: 88% über beide Stufen.

Analyse für $\text{C}_{188}\text{H}_{295}\text{N}_{32}\text{O}_{48}\text{S}\text{Cl} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (3947,21):

$$\begin{aligned} \text{Ber.: } &\text{C } 57,20 \quad \text{H } 7,84 \quad \text{N } 11,35; \\ \text{Gef.: } &\text{C } 57,23 \quad \text{H } 7,54 \quad \text{N } 11,36. \end{aligned}$$

Aminosäure-Analyse: Ser 1,96, Leu 1,95, Val 0,95, Ala 1,98, Asp 1,96, Pro 0,96, Lys 1,96, Glu 6,20, Gly 2,00, Trp –, Tyr 1,04, Met 1,05, Phe 0,98.

Letzte Fragmentkondensation des Weges A war der Anbau von Fragment VI, d. i. H-Pyr-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-His(AdOC)-Pro-OH [1 – 8c] an oben genanntes Hexakosapeptidamid [9 – 34b] – freigesetzt in üblicher Weise aus einem Hydrochlorid – unter Anwendung der Carbodiimid-Hydroxysuccinimid-Methode:



konnte in hoher Reinheit (lediglich geringe Mengen an Oktapeptid-Derivat [1–8c] im chromatographischen Test *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 3:1:1 nachweisbar) und ca. 75-prozentiger Ausbeute erhalten werden.

Aminosäure-Analyse: Glu 8,08, Leu 2,87, Gly 3,96, Pro 4,17, His 0,92, Ser 1,98, Val 0,97, Ala 1,97, Asp 2,05, Lys 1,95, Trp 1,79, Tyr 1,04, Met 1,07, Phe 1,02.

2. Erstellung der Gesamtsequenz 1–34 nach Weg B (s. Schema 7)

Voraussetzung für die nach Weg B geplanten Fragmentverknüpfungen war eine „Umformung“ von Fragment IV [15–20a], d. h. ein „Tausch“ der α -Aminoschutzgruppe an diesem Teilstück. Zu diesem Zweck wurde Fragment IV [15–20a] hydrogenolytisch entacyliert und das erhaltene freie, aber „seitenkettenmaskierte“ Hexapeptid [15–20b]

in bekannter Manier mit 2-Nitrophenylsulfonylchlorid zu NPS-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Lys(BOC)-Gln-Gly-Pro-OH [15–20c] umgesetzt. Dieses „abgeänderte“ Fragment IV wurde via Aktivester mit H-Trp-Leu-OH [21–22b] (= Fragment III) zum „neuen“ Sequenzteilstück III–IV, d. i.

NPS-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Lys(BOC)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-OH [15–22c]

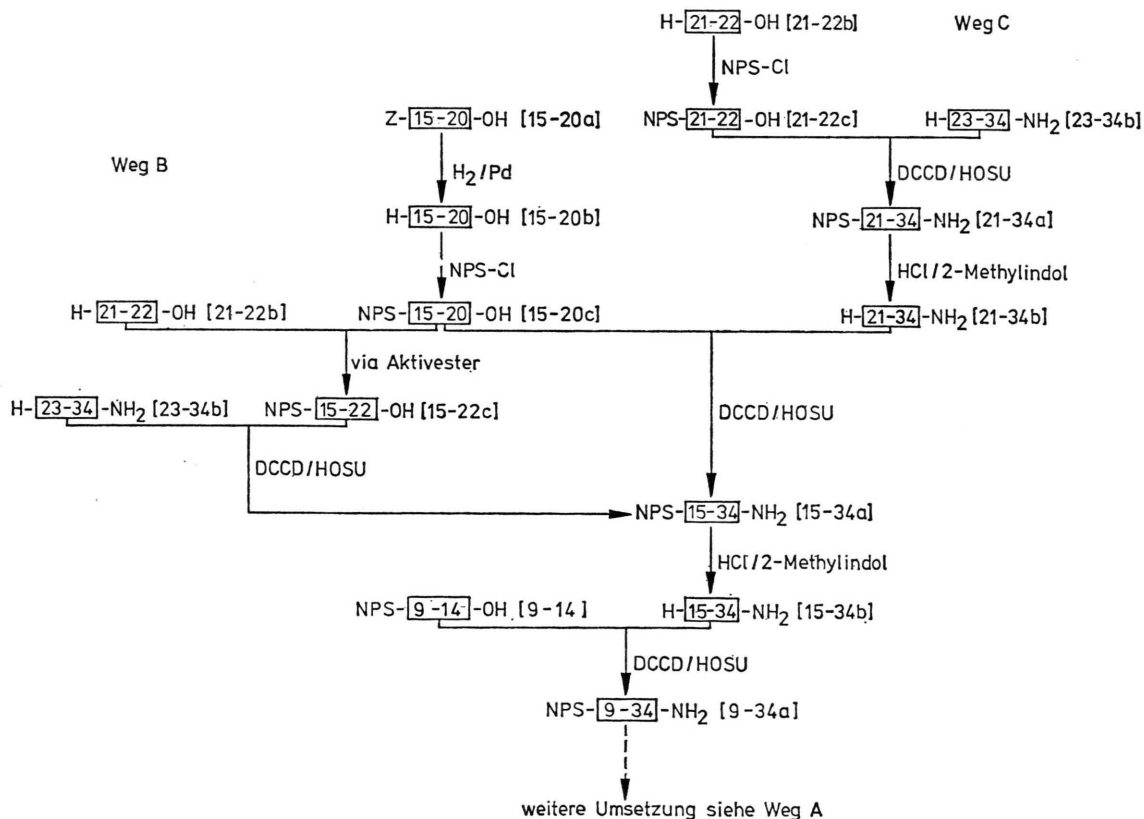
verknüpft. Chromatographisch rein in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 3:1:1, *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin 60:6:24:20 und Chloroform/Methanol 3:1.

Schmelzpunkt: 216–218 °C; $[\alpha]_D^{20} = -36,9^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -42,1^\circ$ ($c = 1$ in Dimethylformamid).

Ausbeute: >65% über drei Stufen.

Analyse für $C_{64}H_{97}N_{13}O_{17}S$ (1352,6):

Ber.: C 56,83 H 7,23 N 13,46;
Gef.: C 56,78 H 7,34 N 13,29.



Schema 7: Gesamtsequenz 1–34, Wege B und C

Aminosäure-Analyse: Ser 1,03, Lys 2,11, Glu 0,98, Gly 0,98, Pro 1,02, Trp 1,00, Leu 1,00.

Oben beschriebenes Sequenzteilstück III – IV [15 – 22c] wurde nun mit dem Sequenzteilstück I – II [23 – 34b] nach dem Wünsch-Weygandschen Verfahren zum seitenkettengeschützten Nitrophenylsulfenyl-Eikosapeptidamid [15 – 34a] kondensiert. Die Abspaltung des 2-Nitrophenylsulfenyl-Restes von diesem Peptid-Derivat gelang wiederum einwandfrei mittels Chlorwasserstoff/2-Methylindol:

H-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Lys(BOC)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ala-Tyr(tBu)-Gly-Trp-Met-Asp(OtBu)-Phe-NH₂ [15 – 34b]

wurde in Form des Hydrochlorids isoliert. Chromatographisch rein in Chloroform-Trifluoräthanol 3:1, 2-Butanol/Essigsäure/Wasser 3:1:1.

$[\alpha]_D^{20} = -16,2^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -19,6^\circ$ ($c = 0,6$ in Trifluoräthanol).

Ausbeute: 63,5% über beide Stufen.

Analyse für C₁₅₄H₂₃₇N₂₆O₃₉·6H₂O (3252,355):

Ber.: C 56,87 H 7,72 N 11,20;

Gef.: C 56,76 H 7,55 N 11,20.

Auf das erstellte Sequenzteilstück I – IV [15 – 34b] wurde, wiederum nach genanntem Verknüpfungsverfahren, Fragment V [9 – 14] angebaut und so auf diesem Wege B das schon vorher beschriebene (s. o. Weg A) 2-Nitrophenylsulfenyl-Hexakosapeptidamid [9 – 34a] in gleicher Reinheit und mit weitestgehend analogen analytischen Daten zugänglich gemacht. Chromatographisch rein in Chloroform/Trifluoräthanol 3:1 und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 3:1:1.

$[\alpha]_D^{20} = -14,6^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -16,9^\circ$ ($c = 0,5$ in Dimethylformamid).

Ausbeute: 82%.

Analyse für C₁₉₄H₂₉₇N₃₃O₅₀S₂·4H₂O (4027,885):

Ber.: C 57,85 H 7,63 N 11,48;

Gef.: C 57,88 H 7,49 N 11,45.

Aminosäure-Analyse: Ser 1,95, Leu 2,01, Val 1,03, Ala 2,06, Asp 1,93, Pro 2,03, Lys 1,94, Glu 6,07, Gly 2,05, Trp 2,03, Tyr 1,05, Met 0,97, Phe 1,04.

Von dieser Stufe an folgt diese Synthese der vorgezeichneten Route nach Weg A mit identischem Er-

folg (Abspaltung des 2-Nitrophenylsulfenyl-Restes; Kondensation des erhaltenen Sequenzteilstücks I – V [9 – 34b] mit Fragment VI [1 – 8c]).

3. Erstellung der Gesamtsequenz I – 34 nach Weg C. (s. Schema 7)

Aufbauend auf dem bei Weg A bereits beschriebenen Sequenzteilstück I – II [23 – 34b] wurde durch Ankondensation eines „neuen“ Fragments III, d. i. NPS-Trp-Leu-OH [21 – 22c] – erhalten in 71-prozentiger Ausbeute durch übliche Sulfenylierung von H-Trp-Leu-OH [21 – 22b] (= Fragment III) –, das Sequenzteilstück I – III in Gestalt des 2-Nitrophenylsulfenyl-Tetradeka-peptid-Derivats [21 – 34a] erstellt, daraus nach N_α-Demaskierung mittels Chlorwasserstoff/2-Methylindol

H-Trp-Leu-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ala-Tyr(tBu)-Gly-Trp-Met-Asp(OtBu)-Phe-NH₂ [21 – 34b]

in Form des Hydrochlorids gewonnen.

Dieses Tetradeka-peptidamid [21 – 34b] wurde mit dem bei Weg B beschriebenen „abgeänderten“ Fragment IV [15 – 20c] nach dem üblichen Carbodiimid-Hydroxysuccinimid-Verfahren vereinigt zu

NPS-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Lys(BOC)-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ala-Tyr(tBu)-Gly-Trp-Met-Asp(OtBu)-Phe-NH₂.

Chromatographisch rein in Chloroform/Trifluoräthanol 3:1 bzw 3:2 und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 3:1:1; $[\alpha]_D^{20} = -10,9^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -12,1^\circ$ ($c = 0,5$ in Trifluoräthanol) in guter Übereinstimmung mit dem nach Weg B erhaltenen Material.

Ausbeute: 64% über drei Stufen.

Analyse für C₁₆₀H₂₃₉N₂₇O₄₁S₂·2H₂O (3296,98):

Ber.: C 58,29 H 7,43 N 11,47;

Gef.: C 58,31 H 7,34 N 11,48.

Nunmehr folgt Weg C der nach Weg B bzw. Weg A vorgezeichneten Route jeweils mit weitestgehend identischen Ergebnissen je Stufe.

C. Reindarstellung des synthetischen Human-Big-Gastrins I

Das erhaltene seitenkettengeschützte Tetratrikontapeptid-amid [1 – 34a] wurde durch übliche

Einwirkung von Trifluoressigsäure in Gegenwart von Anisol und Äthandithiol als „Scavenger“ von allen Schutzgruppen befreit, das erhaltene Rohprodukt (HBG-A) einer Ionenaustauschchromatographie

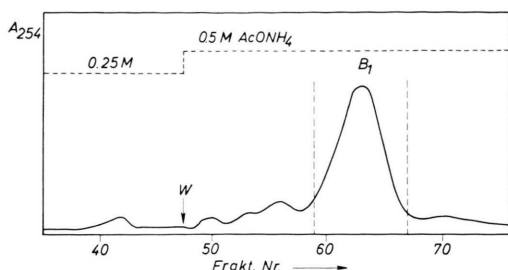


Abb. 1. Ionenaustauschchromatographie von rohem, synthetischem Human-Big-Gastrin I an DEAE-Sephadex A-25; Elutionskurve. Säule: 40×2 cm. 180 mg Rohprodukt HBG-A gelöst in 10 ml 1-prozentigem Ammoniak. Elutionsmittel: 1. 0,25 M Ammoniumacetat-Lösung (pH 6,8); 2. 0,5 M Ammoniumacetat-Lösung (pH 6,8); W = Pufferwechsel. Durchflußgeschwindigkeit: 76 ml/Std.; 38 ml Fraktionen.

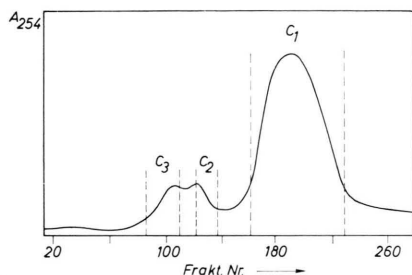


Abb. 2. Verteilungschromatographie von vorgereinigtem Human-Big-Gastrin I an Sephadex G-25 im Zweiphasensystem Butanol-(2)/Äthanol/0,1 M Ammoniumacetat-Lösung (25 : 0,8 : 20); pH 8,0 in der Unterphase. Elutionskurve. Säule: 200×2 cm. 60 mg Fraktion HBG-B₁ gelöst in 15 ml Oberphase; Elution mit Oberphase. Durchflußgeschwindigkeit: 24 ml/Std.; 12 ml Fraktionen.

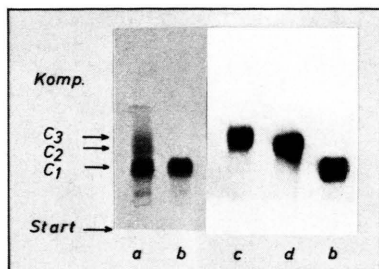


Abb. 3. Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-60-Fertigplatte (Merck) in Butanol-(2)/Propanol-(2)/0,9-prozentige Monochloressigsäure (30:4:26); Anfärbung mit Chlor/Tolidin-Reagens. a) Roh-Human-Big-Gastrin I (= HBG-A); b) Reines synthetisches Human-Big-Gastrin I (= Fraktion HBG-C₁); c) Fraktion HBG-C₃ (nach Verteilungschromatographie); d) Fraktion HBG-C₂.

phie an DEAE-Sephadex A-25 unterworfen (s. Abb. 1). Die abgetrennte Fraktion HBG-B₁ ließ sich durch anschließende Verteilungschromatographie an Sephadex G-25 von zwei Nebenprodukten — genannt HBG-C₂ und HBG-C₃ — befreien (s. Abb. 2). Die isolierte Hauptfraktion HBG-C₁ wurde nach Gel-filtration an Biogel P-6 (zwecks vorteilhafter Entfernung von „Fremdstoffen“, die bei den vorangehenden Chromatographie-Prozessen eingeschleppt wurden; Elutionsmittel 0,025 M Ammoniumacetat, pH 8,0) durch Gefriertrocknung in fester Form erhalten. Ausbeute 60 mg [1–34b] aus 200 mg [1–34a].

HBG-C₁ zeigte sich dünnschichtchromatographisch einheitlich vor allem im System Butanol-(2)/Propanol-(2)/0,9-prozentige Monochloressigsäure (30:4:26), wobei die Wanderungsgeschwindigkeit der zwei isolierten Nebenfraktionen HBG-C₂ und -C₃ von der des Hauptflecks deutlich differierten (s. Abb. 3) und dünnschichtelektrophoretisch einheitlich im System Pyridin/Ameisensäure/Wasser (10:1:89; pH 6,0).

Eine doppelte Aminosäureanalyse des erhaltenen gefriergetrockneten synthetischen Human-Big-Gastrins I (= HBG-C₁) erbrachte einwandfreie Werte für die Aminosäure-Bestandteile und einen Peptidgehalt von ca. 80% (s. Tab. 1). Ferner wurde bei einer für das Hormon sehr spezifischen Circular-dichroismus-Kurve (Minimum bei 198 nm (in Wasser): $[\theta]_{\min} = -17\,900$ [Grad·cm²/Dezimol]; Gehalt an α -Helix ca. 12–15%, berechnet nach

Tab. 1. Aminosäureanalysen von synthetischem Human-Big-Gastrin I nach saurer Hydrolyse mit 6 N HCl (24 h; 110 °C) unter Zusatz von Thioglykolsäure (2,5%); Doppelbestimmung.

	Analyse A	Analyse B	Ber. Verh. für Human-Big- Gastrin I
Lys	1,99	1,98	2
His	0,99	1,01	1
Trp	1,96	1,94	2
Asp	2,00	2,01	2
Ser	2,04	2,06	2
Glu	8,00	8,01	8
Pro	4,00	4,00	4
Gly	3,94	3,96	4
Ala	1,99	2,01	2
Val	1,01	1,01	1
Met	1,02	1,01	1
Leu	3,01	3,00	3
Tyr	1,01	1,01	1
Phe	1,01	1,02	1
Peptidgeh.	79,9%	80,2%	

Lit.^{12, 13)} eine UV-Absorption bei 280 nm (in Wasser) mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 12\,325$ (berechnet 12 316 für 2 Trp + 1 Tyr) gefunden.

Die biologische Aktivität des synthetischen Human-Big-Gastrins I wurde im Vergleich zu synthetischem 15-Leucin-Human-Gastrin I zu ca. 150% ermittelt¹⁴ (letzteres hat die gleiche biologische Aktivität wie natürliches Human-Gastrin I).

Die Synthese von 32-Leucin-Human-Big-Gastrin I wurde ausgehend vom Dodekapeptid-amid-Derivat der Sequenz 28–34, d. i.

H-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-
Glu(OtBu)-Ala-Tyr(tBu)-Gly-Trp-Leu-
Asp(OtBu)-Phe-NH₂ [28–34d] –

bereits früher bei der Synthese von 15-Leucin-Human-Gastrin I beschrieben¹⁵, aber nunmehr auf einem verbesserten Wege zugänglich gemacht –, in Befolgung des Weges A der Fragmentverknüpfung (s. o.) durchgeführt. Nach weitgehend analoger Aufarbeitung wurde synthetisches 32-Leucin-Human-Big-Gastrin I (= LHBG-C₁) in „HBG-C₁-vergleichbarer“ Reinheit gewonnen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sind wir für die Förderung dieser Arbeit durch Gewährung einer Sachbeihilfe zu hohem Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. J. Konturek, Universität Krakau, Polen, sagen wir für seine Bereitschaft zur Zusammenarbeit unseren Dank.

¹ R. A. Gregory u. H. J. Tracy, *Lancet* **1972**, 792.

² R. A. Gregory u. H. J. Tracy, in *Gastrointestinal Hormones, Symposium* (Hersg. J. C. Thompson), S. 13–14, University of Texas Press, Austin, USA 1975.

³ G. W. Kenner, *Biochem. Soc. Meeting, Edinburgh, Vortrag*, 1975.

⁴ E. Wünsch, *Z. Gastroenterologie* **1976**, 166–172.

⁵ A. M. Choudhury, G. W. Kenner, S. Moore, R. Ramage, P. M. Richards, W. D. Thorpe, L. Moroder, G. Wendberger u. E. Wünsch in *Peptides 1976* (Hersg. A. Loffet), S. 257–261, Editions de l'Université de Bruxelles, Bruxelles (Belgien) 1976.

⁶ E. Wünsch, *Z. Naturforsch.* **22b**, 1269–1276 [1967].

⁷ E. Wünsch u. K.-H. Deimer, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **353**, 1716–1720 [1972].

⁸ F. Weygand, D. Hoffmann u. E. Wünsch, *Z. Naturforsch.* **21b**, 426–428 [1966].

⁹ G. W. Kenner *et al.*, persönliche Mitteilung.

¹⁰ J. Honzl u. J. Rudinger, *Coll. Czech. Chem. Commun.* **26**, 2333–2344 [1961].

¹¹ L. Moroder, L. Wackerle u. E. Wünsch, *Hoppe-Seyler's, Z. Physiol. Chem.* **357**, 1647–1650 [1976].

¹² J. H. Straus, A. S. Gordon u. D. F. H. Wallach, *Europ. J. Biochem.* **11**, 201–212 [1969].

¹³ N. Greenfield u. G. D. Fasman, *Biochemistry* **8**, 4108–4116 [1969].

¹⁴ J. Konturek, J. Tasler, M. Cieszkowski, M. Dobrańska u. E. Wünsch, *Am. J. Physiol.*, im Druck.

¹⁵ E. Wünsch u. K.-H. Deimer, *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* **353**, 1255–1258 [1972].

¹⁶ H. Matsubara u. R. M. Sasaki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **35**, 175–181 [1969].