

Totalsynthese von Somatostatin-28 (Big-Somatostatin)

Total Synthesis of Somatostatin-28
(Big Somatostatin)

E. Wünsch*, L. Moroder, M. Gemeiner und E. Jaeger

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

A. Ribet, L. Pradayrol und N. Vaysse

I. N. S. E. R. M U 151, C. H. U.-Ranguel, Toulouse, Frankreich

Z. Naturforsch. **35b**, 911–919 (1980); eingegangen am 4. Juni 1980

Synthetic Peptide Hormones, Somatostatin-28

The total synthesis of the octacosapeptide corresponding to the proposed primary structure of porcine somatostatin-28, a possible precursor of somatostatin, is described. The primary structure of somatostatin-28 corresponds to that of somatostatin elongated at the N-terminus by a tetradecapeptide sequence. The synthesis has been performed using the strategy of overall acid labile side chain protection based on *tert*-butanol and adamantol derived protecting groups in combination with the *S-tert*-butylthio group for the reversible blocking of the cysteine thiol functions and the N^{α} -2-nitrophenylsulfenyl group for the chain elongation steps. Upon assembly in sequence order of the four suitably protected fragments related to sequence 18–28, 15–17, 8–14 and 1–7, respectively, reductive cleavage of the *S-tert*-butylthio groups from the fully protected octacosapeptide, followed by acidolytic deprotection *via* exposure to trifluoroacetic acid and subsequent air oxidation led to crude somatostatin-28. Purification by gel filtration on Biogel P 6 and ion exchange chromatography on Biogel CM 2 produced the desired product in satisfactory yields and at a high degree of purity as judged from different analytical tests. The correctness of the proposed primary structure was ultimately proofed by comparative analysis of the synthetic and natural product by means of chromatographic, immunological and biological assays.

Untersuchungen verschiedener Gewebsextrakte auf ein Vorkommen von Somatostatin [1] mittels radioimmunologischer Methoden ließen die Vermutung nach somatostatin-wirksamen Stoffen höherer Kettenlänge zu [2–6]. L. Pradayrol *et al.* gelang es, in der Folge aus Gewebe des oberen intestinalen Trakts von Schweinen einen Peptidfaktor mit Somatostatinwirkung zu isolieren [7] und als Octacosapeptid zu erkennen [8]. Die Ermittlung der Primärstruktur bereitete zunächst Schwierigkeiten: erst mit Hilfe von Vergleichsanalysen unter Hinzuziehung synthetischer Teilstücke konnte die richtige

Primärstruktur gesichert werden. Gegenüber dem Erstvorschlag mußten die Aminosäure-Reste in Position 4 (Arginin) nunmehr Serin und 13 (Serin) nunmehr Arginin vertauscht werden (s. Abb. 1).

Die endgültige Beweisführung des neuen Strukturvorschlags ist mit der vorliegenden Totalsynthese dieses Octacosapeptides – in seinen biologischen und immunologischen Daten mit dem Naturstoff im Rahmen der Fehlergrenzen identisch – gelungen.

Basierend auf den Erfahrungen unserer Somatostatin-Synthese [9] nach dem „*S-tert*-Butylthio-Verfahren zur Herstellung von cysteinhaltigen

Ser-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys-Ala-
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-OH
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

Abb. 1. Primärstruktur von Somatostatin-28**.

* Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. E. Wünsch.
0340-5087/80/0700-0911/\$ 01.00/0

** Für die Abkürzungen der Aminosäuren und Schutzgruppen 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.

Peptiden“ [10–11] wurde folgender Synthesepfad für das Octacosapeptid nach der Schwyzer-Wünsch-Strategie ausgerichtet:

A. Ausgehend vom C-terminalen Undecapeptid-Derivat der beschriebenen Somatostatin-Synthese [9] (Fragment I, Teilsequenz 18–28) wurden die Fragmente II, III und IV der Teilsequenzen 15–17, 8–14 und 1–7 der Somatostatin-28-Peptidkette aufgebaut.

B. Die vier Fragmente wurden in Sequenzfolge nach dem weitgehend racemisierungsfreien Wünsch-Weygandschen Verfahren [12, 13] zur allseits maskierten Gesamtsequenz 1–28 verknüpft.

C. Nach Reduktion der asymmetrischen Disulfide und nach acidolytischer Entfernung der restlichen Schutzgruppen wurde das erhaltene Rohprodukt durch Luftoxidation in die „cyclische Form“ überführt.

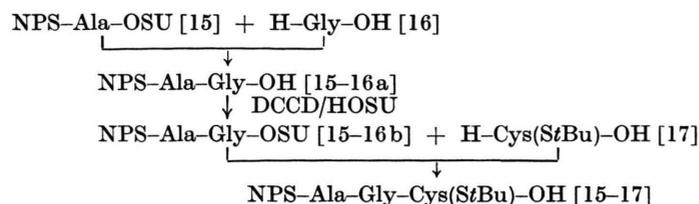
A. Erstellung der Fragmente

1. Teilsequenz 18–28 (Fragment I)

H-Lys(AdOC)-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys(BOC)-Thr(*t*Bu)-Phe-Thr(*t*Bu)-Ser(*t*Bu)-Cys(*St*Bu)-OtBu wurde auf dem gleichen Wege erhalten, der für das Undecapeptid-Derivat als Zwischenprodukt unserer Somatostatin-Synthese früher beschrieben worden war [9].

2. Teilsequenz 15–17 (Fragment II) (s. Schema 1)

Aminoacylierung von Glycin [16] mit NPS-Ala-OSU [15] führte zu NPS-Ala-Gly-OH [15–16a], dessen analytische Werte mit den in der Literatur [14–15] angegebenen bestens übereinstimmen. Die Umsetzung des Dipeptid-Derivats [15–16a] *via* N-Hydroxysuccinimidester [15–16b] mit *S-tert*-Butylthio-Cystein [17] erbrachte das gewünschte Tripeptid-Derivat [15–17], d.i. NPS-Ala-Gly-Cys(*St*Bu)-OH. Dünnschichtchromatographisch einheitlich in *n*-Heptan/*tert*-Butanol/Essigsäure 5:1:1, Methanol/Essigsäure/Methylenchlorid 1:2:3 und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin/Essigsäureethylester 60:6:24:20:110. Schmp. 78–82 °C; $[\alpha]_D^{20} = -106,9^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -117,1^\circ$ ($c=1$ in Methanol). Ausbeute: 72% über die drei Stufen.



Schema 1. Teilsequenz 15–17 (Fragment II).

Analyse für $C_{18}H_{26}N_4O_6S_3$ (490,64)

Ber.	C 44,07	H 5,34	N 11,42	S 19,61,
Gef.	C 43,88	H 5,33	N 11,28	S 19,53.

3. Teilsequenz 8–14 (Fragment III) (s. Schema 2)

Die Umsetzung von H-Lys(BOC)-OH [14] mit Z-Arg(δ, ω -Z₂)-OSU [13] lieferte erwartungsgemäß das Dipeptid-Derivat [13–14a]. Nach Entfernung der drei Benzylloxycarbonyl-Gruppierungen durch katalytische Hydrierung unter Zusatz von zwei Äquivalenten Chlorwasserstoff wurde H-Arg(HCl)-Lys(BOC)-OH·HCl [13–14b·HCl] in *ca.* 66-proz. Ausbeute über beide Schritte, isoliert. Die Aufstockung der weiteren zwei Aminosäure-Reste auf [13–14b] verlief unter Einsatz von Z-Glu(*Ot*Bu)-OSU [12] und Z-Arg(δ, ω -Z₂)-OSU [11] zu den Peptid-Derivaten [12–14a] bzw. [11–14a] mit jeweils folgender hydrogenolytischer Debenzyloxycarbonylierung zum Tripeptid- [12–14b] bzw. Tetrapeptid-Derivat [11–14b], d.i. H-Arg(HBr)-Glu(*Ot*Bu)-Arg(HBr)-Lys(BOC)-OH, isoliert als Hydrobromid in *ca.* 58-proz. Ausbeute (über vier Stufen).

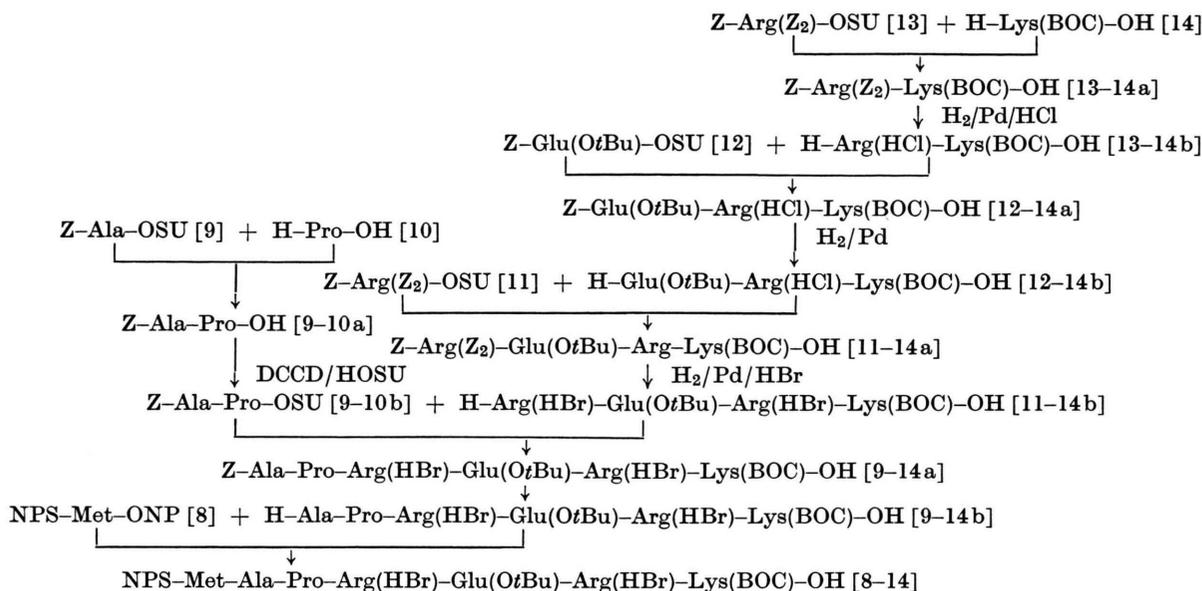
Gleichzeitig wurde Prolin [10] mittels Z-Ala-OSU [9] zum Dipeptid-Derivat Z-Ala-Pro-OH [9–10a] umgesetzt; dessen N-Hydroxysuccinimidester [9 bis 10b] reagierte mit dem Tetrapeptid-Derivat [11–14b] zu Z-Ala-Pro-Arg(HBr)-Glu(*Ot*Bu)-Arg(HBr)-Lys(BOC)-OH [9–14a]. Das nach hydrogenolytischer N $^{\alpha}$ -Deblockierung erhaltene freie, aber seitenkettengeschützte Hexapeptid-Derivat [9–14b] ließ sich mit NPS-Met-ONP [8] direkt zum gewünschten Fragment III, d.i. NPS-Met-Ala-Pro-Arg(HBr)-Glu(*Ot*Bu)-Arg(HBr)-Lys(BOC)-OH [8–14] umsetzen; chromatographisch einheitlich in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 3:1:1, *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin 60:6:24:20 und Methanol/Essigsäure/Pyridin/Wasser/Essigsäureethylester 20:6:20:24:60. Schmp.: 135–140 °C; $[\alpha]_D^{20} = -42,7^\circ$ bzw. $[\alpha]_{546}^{20} = -46,4^\circ$ ($c=1$ in Dimethylformamid).

Aminosäureanalyse: Glu 1,01; Pro 0,95; Ala 1,03; Met 0,94; Lys 1,00; Ag 2,00.

Analyse für $C_{51}H_{85}N_{15}O_{14}S_2 \cdot 2HBr$ (1358,33)

Ber.	C 45,10	H 6,46	N 15,47	S 4,72	Br 11,77,
Gef.	C 45,40	H 6,60	N 15,25	S 4,75	Br 11,79.

Ausbeute: 83% über drei Stufen.

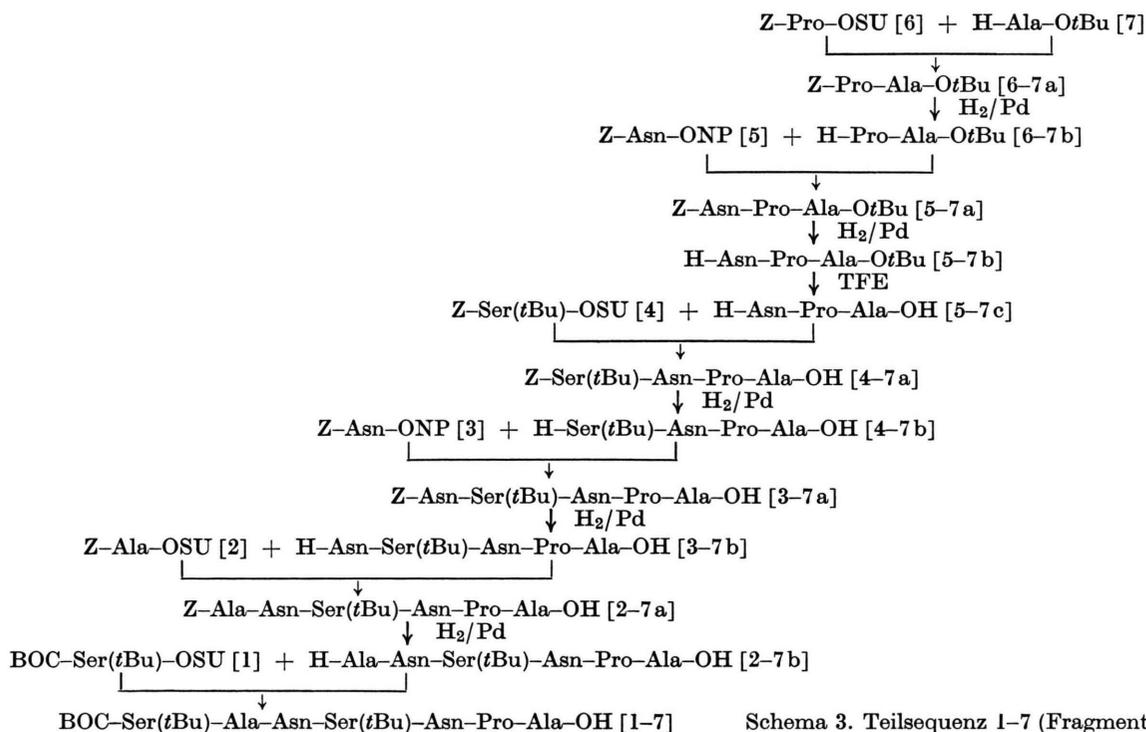


Schema 2. Teilsequenz 8-14 (Fragment III).

4. Teilsequenz 1-7 (Fragment IV) (s. Schema 3)

H-Ala-OtBu [7] wurde mit Z-Pro-OSU [6] zum Benzyloxycarbonyl-Dipeptidester [6-7 a] verknüpft und nach hydrogenolytischer Entfernung der N α -Schutzgruppe der resultierende Dipeptidester [6-7 b]

mit Z-Asn-ONP [5] zum Tripeptid-Derivat [5-7 a] aufgestockt. Erneute hydrogenolytische N α -Demaskierung und anschließende acidolytische Spaltung der *tert*-Butylester-Gruppierung lieferten H-Asn-Pro-Ala-OH [5-7 c]. An dieses Tripeptid wurde im



Schema 3. Teilsequenz 1-7 (Fragment IV).

stufenweisen Verfahren Z-Ser(*t*Bu)-OSU [4], Z-Asn-ONP [3], bzw. Z-Ala-OSU [2] angebaut zu den Peptid-Derivaten [4–7a], [3–7a] bzw. [2–7a], jeweils mit folgender hydrogenolytischer Entfernung der N α -Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe zum freien, nur „seitenketten-blockierten“ Tetrapeptid [4–7b], Pentapeptid [3–7b] bzw. Hexapeptid [2–7b]. Letzteres konnte mit BOC-Ser(*t*Bu)-OSU [1] zum gewünschten Fragment IV, d. i. BOC-Ser(*t*Bu)-Ala-Asn-Ser(*t*Bu)-Asn-Pro-Ala-OH [1–7] verknüpft werden; dünn-schichtchromatographisch einheitlich in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 3:1:1 und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin 60:6:24:20; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -50,1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -60,5^\circ$ ($c = 1$ in Dimethylformamid); Schmp.: 188–189 °C.

Analyse für $\text{C}_{38}\text{H}_{65}\text{N}_9\text{O}_{14} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (890,0)

Ber. C 51,28 H 7,59 N 14,16,
Gef. C 51,28 H 7,60 N 14,13.

Aminosäure-Analyse: Asp 1,95, Ser 2,10, Pro 1,01, Ala 1,93. Ausbeute: 46% über alle Stufen bezogen auf H-Ala-O*t*Bu [7] als Startmaterial.

B. Verknüpfung der Fragmente

Erstellung der Gesamtsequenz 1–28 (s. Schema 4)

An Fragment I, d. i. H-Lys(AdOC)-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys(BOC)-Thr(*t*Bu)-Phe-Thr(*t*Bu)-Ser(*t*Bu)-Cys(*t*Bu)-O*t*Bu [18–28b] wurde Fragment II, d. i. NPS-Ala-Gly-Cys(*t*Bu)-OH [15–17] nach dem Carbodiimid-Hydroxysuccinimid-Verfahren zum Tetradecapeptid-Derivat [15–28a] angeknüpft; für die anschließende Entfernung der

2-Nitrophenylsulfonyl-Schutzgruppe erwies sich die Einwirkung von Chlorwasserstoff/2-Methylindol in Dimethylformamid als Methode der Wahl:

H-Ala-Gly-Cys(*t*Bu)-Lys(AdOC)-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys(BOC)-Thr(*t*Bu)-Phe-Thr(*t*Bu)-Ser(*t*Bu)-Cys(*t*Bu)-O*t*(Bu) [15–28b] konnte so als dünn-schichtchromatographisch einheitliches Produkt in Chloroform/Trifluorethanol 3:1, Chloroform/Methanol/Trifluorethanol 8:2:2 in *ca.* 90-proz. Ausbeute über beide Stufen erhalten werden; Schmp.: 227 °C (Zers.); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -37,1^\circ$ bzw. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -44,3^\circ$ ($c = 0,5$ in Dimethylformamid).

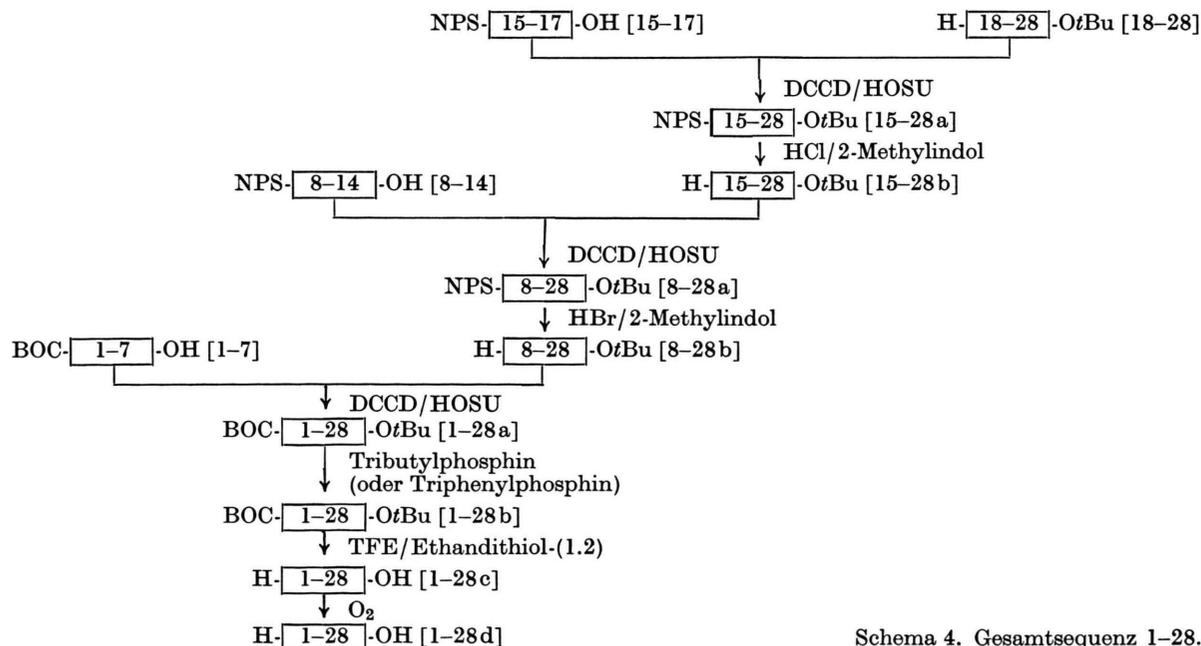
Analyse für $\text{C}_{116}\text{H}_{176}\text{N}_{18}\text{O}_{23}\text{S}_4$ (2319,06)

Ber. C 60,08 H 7,65 N 10,87 S 5,53,
Gef. C 59,90 H 7,64 N 10,97 S 5,31.

Aminosäure-Analyse: Asp 1,06, Thr 1,91, Ser 0,91, Gly 1,02, Ala 1,01, Phe 3,00, Lys 1,77, Trp 0,94. Ausbeute: 83% über beide Stufen.

Teilstück I–II wurde nunmehr mit Fragment III, d. i. NPS-Met-Ala-Pro-Arg(HBr)-Glu(O*t*Bu)-Arg(HBr)-Lys(BOC)-OH [8–14] nach dem Wunsch-Weygandschen Verfahren zum seitenketten-geschützten Nitrophenylsulfonyl-Eneicosapeptid-*tert*-butylester [8–28a] kondensiert. Die folgende Abspaltung des 2-Nitrophenylsulfonyl-Restes erfolgte zweckmäßig mit Bromwasserstoff/2-Methylindol um eine Einheitlichkeit der Gegenionenart (N $^\ominus$ -Arginin-Schutz!) zu gewährleisten:

H-Met-Ala-Pro-Arg(HBr)-Glu(O*t*Bu)-Arg(HBr)-Lys(BOC)-Ala-Gly-Cys(*t*Bu)-Lys(AdOC)-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys(BOC)-Thr(*t*Bu)-Phe-Thr(*t*Bu)-Ser(*t*Bu)-Cys(*t*Bu)-O*t*Bu [8–28b] wurde in Form



Schema 4. Gesamtsequenz 1–28.

des Hydrobromids isoliert. Dünnschichtchromatographisch weitestgehend einheitlich in Chloroform/80-proz. Essigsäure/Trifluorethanol 2:0,5:0,5 und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 3:1:1 bis auf eine Spur Verunreinigung an Methionin-S-oxid-Derivat. Schmp.: 216–220 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -28,3^\circ$ bzw. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -33,6^\circ$ ($c = 1$ in Dimethylformamid).

Analyse für $\text{C}_{161}\text{H}_{259}\text{N}_{32}\text{O}_{34}\text{Br}_3\text{S}_5 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (3605,19)

Ber. C 52,29 H 7,37 N 12,19 Br 6,52,
Gef. C 52,20 H 7,22 N 12,30 Br 6,56.

Aminosäure-Analyse: Asp 1,02, Ser 0,87, Glu 1,00, Gly 1,05, Ala 2,01, Met 0,99, Phe 3,14, Lys 2,94, Trp 0,94, Arg 1,89.

An das erhaltene Eneicosapeptid-Derivat [8–28 b] wurde als letzter Syntheseschritt das Fragment IV, d. i. BOC-Ser(*t*Bu)-Ala-Asn-Ser(*t*Bu)-Asn-Pro-Ala-OH [1–7] nach der Carbodiimid-Hydroxy-succinimid-Methode angebaut:

BOC-Ser(*t*Bu)-Ala-Asn-Ser(*t*Bu)-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg(HBr)-Glu(*Ot*Bu)-Arg(HBr)-Lys(BOC)-Ala-Gly-Cys(*St*Bu)-Lys(AdOC)-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys(BOC)-Thr(*t*Bu)-Phe-Thr(*t*Bu)-Ser(*t*Bu)-Cys(*St*Bu)-*Ot*Bu [1–28 a] konnte in hoher Reinheit [wiederum nur eine Spur Verunreinigung an Methionin-S-oxid-Derivat im dünnschichtchromatographischen Test *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 3:1:1] und in 91-proz. Ausbeute gewonnen werden; Schmp.: 235 °C (Zers.); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -35,3^\circ$ bzw. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -43,0^\circ$ ($c = 0,5$ in Trifluorethanol).

Aminosäure-Analyse: Asp 3,05, Thr 2,06, Ser 2,90, Glu 0,99, Gly 1,07, Ala 3,97, Met 0,88, Phe 3,00, Lys 3,00, Trp 1,00, Arg 2,00 (Peptidgehalt 90%).

C. Reindarstellung des synthetischen Somatostatins-28

Durch Einwirkung von Triphenyl- oder Tributylphosphin auf das allseits geschützte Octacosapeptid-Derivat [1–28 a] in Trifluorethanol wurden beide *S-tert*-Butylthio-Gruppierungen entfernt – unter Verfolgung des Reaktionsverlaufs mittels Dünnschichtchromatographie (*n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 3:1:1 und Chloroform/80-proz. Essigsäure/Trifluorethanol 2:0,5:0,5) und $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie. Anschließende Behandlung des resultierenden [1–28 b] mit Trifluoressigsäure in Gegenwart von ca. 20% Aethandithiol zur Vermeidung einer *tert*-Butylierung der freien Cystein-Thiofunktionen führte zum linearen Dihydrosomatostatin-28 [1–28 c], das sofort in 1 M Ammoniumacetat Puffer (pH 6,8) bei einer $5,10^{-5}$ M Konzentration durch Luftsauerstoff zum cyclischen Disulfid oxidiert wurde.

Das durch Gefriertrocknung erhaltene [1–28 d]-Rohprodukt (S28-A; 220 mg) wurde vorwiegend

zur Abtrennung von polymeren Nebenprodukten einer Gelfiltration an Biogel P-6 (Elutionsmittel 0,1 M Ammoniumacetat, pH 5,4), die gewonnene Hauptfraktion S28-B₁ zwecks Abtrennung weiterer Verunreinigungen einer Ionenaustauschchromatographie an Biogel CM-2 (Elutionsmittel 0,15 M Ammoniumacetat, pH 6,4) unterworfen und das Eluat (Hauptfraktion S28-C₁) gefriergetrocknet: Ausbeute 50 mg.

Das erhaltene Somatostatin-28 [1–28 d] war dünnschichtchromatographisch in den Systemen *n*-Butanol/Essigsäure/Pyridin/Wasser 45:6:20:24 und *n*-Butanol/Ameisensäure/Pyridin/Wasser 45:10:15:20 einheitlich; bei starker Beladung konnte eine Spur

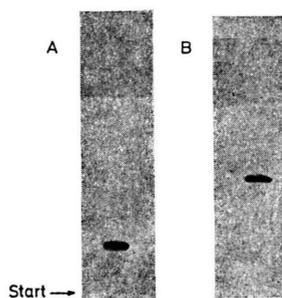


Abb. 2. Dünnschichtchromatographie des synthetischen Somatostatins-28 (S28-C₁) auf HPTLC Kieselgel-60 Fertigplatten (Merck AG) in A) *n*-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser (45:20:6:24); 20 μg und B) *n*-Butanol/Pyridin/Ameisensäure/Wasser (45:15:10:20); 10 μg . Anfärbung mit Chlor/Tolidin-Reagens.

einer Beimengung nachgewiesen werden (s. Abb. 2). Laut Aminosäure-Analyse eines Aminopeptidase-M Hydrolysats [Thr 2,00, Ser 2,94, Asn 3,01, Glu 1,01, Pro 1,85, Ala 4,09, Cys₂ 0,97, Met 0,85, Met(O) \leq 0,01, Phe 3,08, Lys 3,04, Trp 1,00, Arg (als Cit bestimmt) 2,05 (Spaltung 79,3%)] dürfte diese Beimengung aus einem Methionin-S-oxid-Derivat des Somatostatins-28 resultieren. Aminosäure-Analyse eines 6 M HCl-Hydrolysats ergab nachstehende Werte:

Asp 3,01(3), Thr 1,94(2), Ser 2,90(3), Glu 1,04(1), Pro 2,02(2), Gly 0,98(1), Ala 3,98(4), Met 0,98(1), Phe 2,92(3), Lys 2,94(3), Arg 1,94(2); Peptidgehalt ca. 79%.

Die Ergebnisse der Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (s. Abb. 3) wie der trägerfreien Elektrophorese (s. Abb. 4) sprechen für hohe Reinheit für das synthetische Endprodukt (S28-C₁). Im physi-

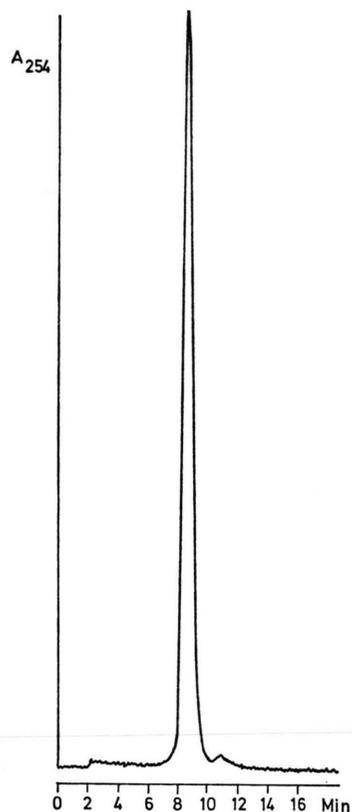


Abb. 3. Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie des synthetischen Somatostatins-28 (S28-C₁) an μ -Bondapak C18; isokratische Elution: Acetonitril/0,2 M Triethylammoniumphosphat (pH 3,5); 24:76 (v/v); Durchflußgeschwindigkeit 1,0 ml/min.

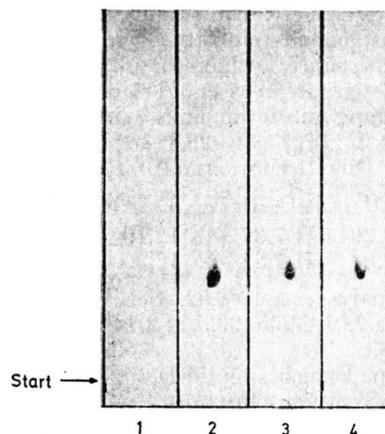
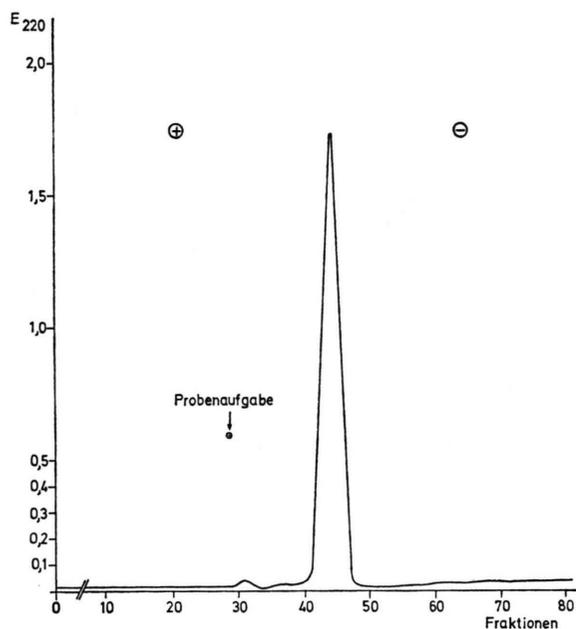


Abb. 5. Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-60 Fertigplatten (Merck AG) in *n*-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser (45:20:6:24); Anfärbung mit Ninhydrin-Reagens; alle Proben wurden in Triethylammoniumphosphat gelöst und aufgetragen: 1) Leerwert; 2) natürliches Somatostatin-28; 3) Gemisch von natürlichem und synthetischem Somatostatin-28 (ca. 1:1); 4) synthetisches Somatostatin-28 (S28-C₁).

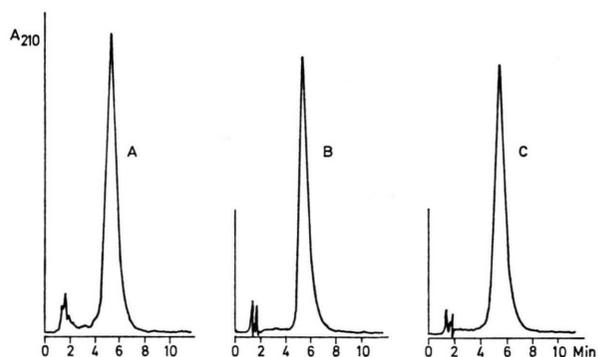


Abb. 6. Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie an μ -Bondapak C18; isokratische Elution: Acetonitril/0,25 M Triethylammoniumphosphat (pH 3,5); 24:76 (v/v); Durchflußgeschwindigkeit 2 ml/min; A) natürliches Somatostatin-28 (ca. 2 μ g); B) synthetisches Somatostatin-28 (S28-C₁; ca. 2 μ g); C) Gemisch von natürlichem und synthetischem Somatostatin-28 (1:1; ca. 2 μ g).

Abb. 4. Trägerfreie Elektrophorese des synthetischen Somatostatins-28 (S28-C₁); Elektroden-Puffer: 0,3 M Ammoniumacetat (pH 4,2); 6600 μ S; Kammer-Puffer: 0,06 M Ammoniumacetat (pH 4,2); 1350 μ S; 2000 V/100 mA.

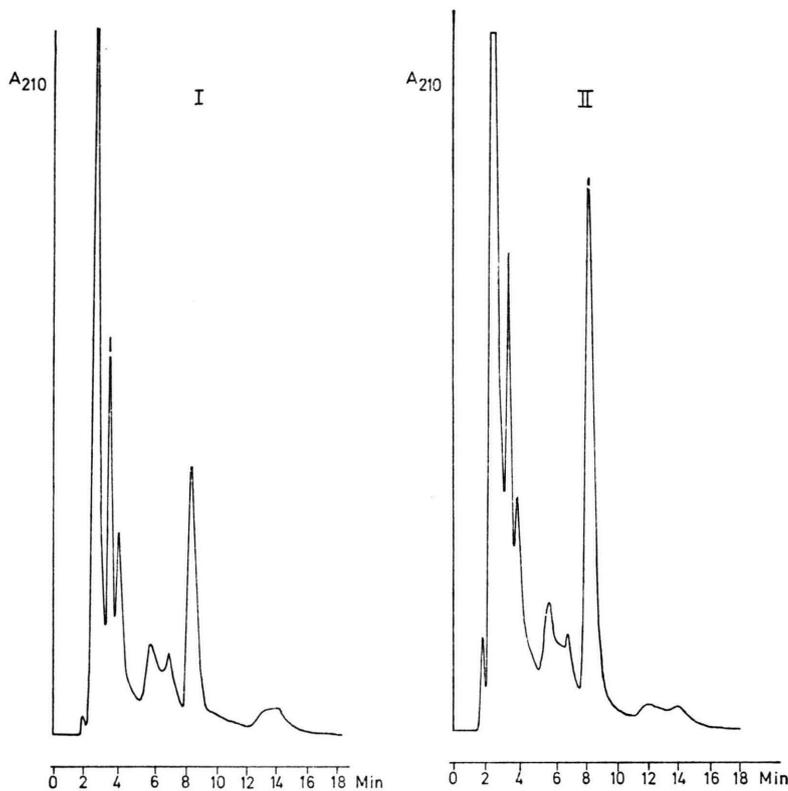


Abb. 7. Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie an μ -Bondapak C18; isokratische Elution: Acetonitril/0,25 M Triethylammoniumphosphat (pH 3,5); 24:76 (v/v); Durchflußgeschwindigkeit 2 ml/min; I) Trypsin-Partialhydrolysat des synthetischen Somatostatin-28 (S 28-C₁); II) Trypsin-Partialhydrolysat des natürlichen Somatostatin-28.

kalisch chemischen Identitätsvergleich von synthetischem Material und natürlichem Präparat wurden A) im dünn-schichtchromatographischen Test identische R_f -Werte (Lösungsmittelsysteme: *n*-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser 15:10:3:12; $R_f \sim 0,45$; *n*-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser

45:20:6:24; $R_f \sim 0,27$; s. Abb. 5); B) in der Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie identische Retentionszeiten sowohl für die unveränderten Peptid-faktoren (s. Abb. 6) als auch für deren Trypsinspaltprodukte (überlappende Elutionsprofile, s. Abb. 7) aufgefunden.

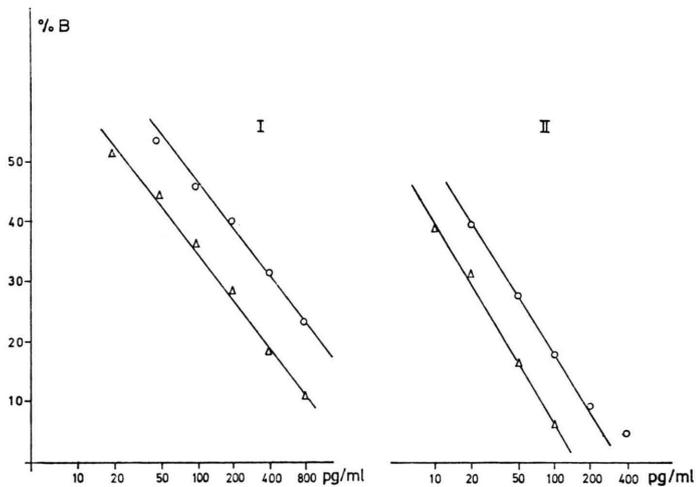


Abb. 8. Radioimmunologischer Vergleich von natürlichem Somatostatin-28 (O-O-O) und synthetischem Somatostatin-28 (S 28-C₁) (Δ-Δ-Δ) mit I) Anti-Somatostatin-Antikörpern 55A (Positionen 6-8 des Somatostatin-14) und II) Anti-Somatostatin-Antikörper 56D (Positionen 8-11 des Somatostatin-14).

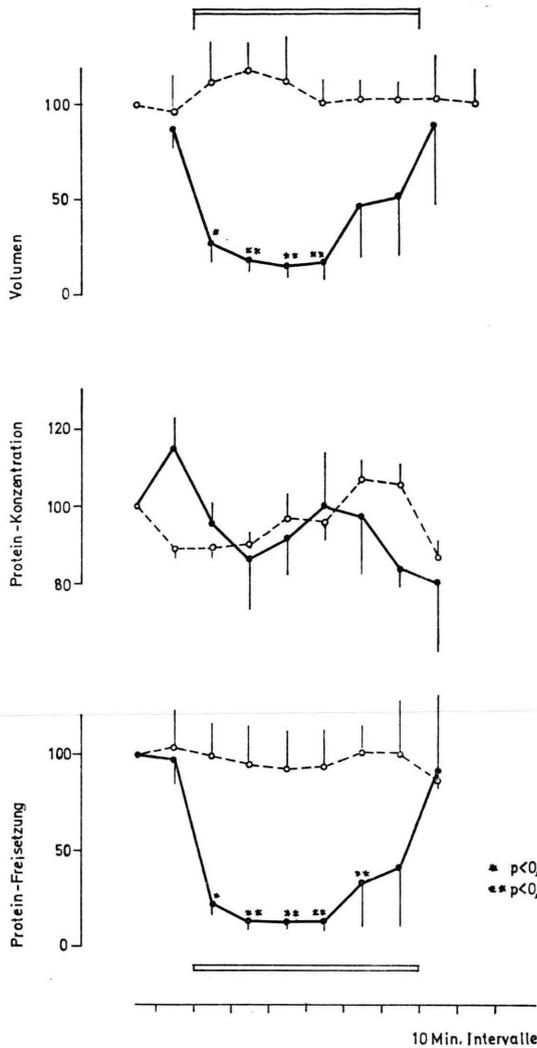


Abb. 9. Hemmwirkung von synthetischem Somatostatin-28 ($400 \text{ ng kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) auf Caerulein ($37,5 \text{ ng kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) stimulierte Protein-Konzentration, Protein-Freisetzung und Volumen in Hunden mit gastrischer und pankreatischer Fistel. Experimente mit synthetischem Somatostatin-28 (S28-C₁): (●); Kontrollwerte: (○). Jeder Punkt ist der Mittelwert \pm S. E. von 4 Bestimmungen.

Radioimmunologische Vergleichsuntersuchungen mit zwei Antikörpern ergaben für synthetisches und natürliches Somatostatin-28 parallel verlaufende Bindungskurven (s. Abb. 8; die etwas verringerte Affinität des natürlichen Präparats ist auf dessen geringeren Peptidgehalt zurückzuführen).

Im biologischen Vergleichstest hemmte synthetisches Somatostatin-28 die Caerulein stimulierte exocrine Sekretion des Pankreas im gleichen Maße wie das natürliche Präparat (s. Abb. 9 und 10).

Herrn J. Musiol und Fräulein R. Scharf danken wir für die Mitwirkung in der präparativen Arbeit, Fräulein E. Weyher für die Ausführung der Aminosäureanalysen und Herrn Dr. S. Knof für die spektroskopischen Bestimmungen.

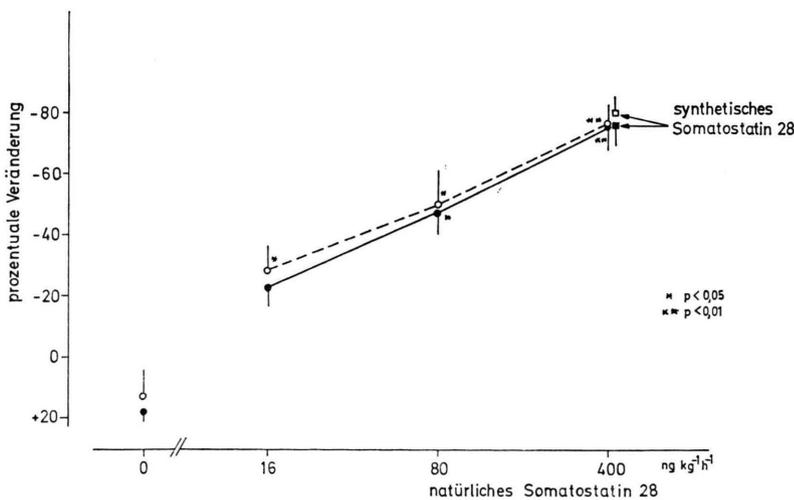


Abb. 10. Prozentuale Veränderung von Volumen (●) und Protein-Freisetzung (○) durch natürliches und synthetisches Somatostatin-28 nach Caerulein ($37,5 \text{ ng kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) Stimulierung.

- [1] R. Burgus, N. Ling, M. Butcher und R. Guillemin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 684 (1973).
- [2] A. V. Schally, A. Dupont, A. Arimura, T. W. Redding, N. Nishi, G. L. Linthicum und D. H. Schlesinger, *Biochem. J.* **15**, 509 (1976).
- [3] A. Arimura, H. Sato, A. Dupont, N. Nishi und A. V. Schally, *Science* **189**, 1007 (1975).
- [4] W. Vale, N. Ling, J. Rivier, J. Villareal, C. Rivier, C. Douglas und M. Brown, *Metabolism* **25**, Suppl. 1, 1491 (1976).
- [5] S. Kronheim, M. B. Berelowitz und B. L. Pimstone, *Diabetes* **27**, 523 (1968).
- [6] L. Pradayrol, J. A. Chayvialle und V. Mutt, *Metabolism* **27**, Suppl. 1, 1197 (1978).
- [7] L. Pradayrol, J. A. Chayvialle, M. Carlquist und V. Mutt, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **85**, 701 (1978).
- [8] L. Pradayrol, H. Jörnvall, V. Mutt und A. Ribet, *FEBS Lett.* **109**, 55 (1980).
- [9] L. Moroder, M. Gemeiner, W. Goehring, E. Jaeger, P. Thamm und E. Wünsch, *Biopolymers*, im Druck.
- [10] E. Wünsch und R. Spangenberg, in E. Scuffone (Herausg.): *Peptides 1969*, S. 30–34, North Holland, Amsterdam 1971.
- [11] E. Wünsch, in E. Wünsch (Herausg.): *Houben Weyl „Methoden der organischen Chemie“*, Bd. XV, *Synthese von Peptiden*, Teil 1, S. 792 bis 796, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974.
- [12] F. Weygand, D. Hoffmann und E. Wünsch, *Z. Naturforsch.* **21b**, 426 (1966).
- [13] E. Wünsch und F. Drees, *Chem. Ber.* **99**, 110 (1966).
- [14] L. Zervas, I. Photaki, A. Cosmatos und D. Borovas, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 4922 (1965).
- [15] A. Brack und G. Spach, *Biopolymers* **11**, 563 (1972).