

Kombination synthetischer Insulinketten zu biologisch aktiven Präparaten*

H. ZAHN, O. BRINKHOFF** und J. MEIENHOFER

Deutsches Wollforschungsinstitut an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen

sowie

E. F. PFEIFFER und H. DITSCHUNEIT

Abteilung für klinische Endokrinologie, I. Medizinische Universitätsklinik Frankfurt/Main

und

CH. GLOXHUBER

Farbenfabriken Bayer A.G., Werk Elberfeld

(Z. Naturforschg. **20 b**, 666—670 [1965]; eingegangen am 3. Mai 1965)

Äquimolare Mengen synthetischer Insulin-A- und -B-Kette wurden in flüssigem Ammoniak durch Natrium gemeinsam von Schutzgruppen befreit und zu einem Präparat mit 0,2—1,0% Insulinaktivität oxydiert. Dessen biologische Wirksamkeit wurde durch Insulin-Antiserum vollständig gehemmt.

DIXON und WARDLAW¹ sowie DU et al.² hatten erstmals eine Resynthese von Insulin aus den vorher getrennten Ketten nativen Insulins beschrieben. Es gelang ihnen, durch Luftoxydation von A- und B-Kette in der Thiolform insulinaktive Präparate zu gewinnen. DU et al.² konnten sogar kristallisiertes Insulin aus derartigen Oxydationsprodukten isolieren, welches chromatographisch, elektrophoretisch und in seinem Verhalten bei der Partialhydrolyse mit Pepsin von nativem Insulin nicht zu unterscheiden war.

In beiden Arbeitskreisen wurden A- und B-Kette in Form ihrer Bunesalz-Derivate durch oxydative Sulfitololyse von Insulin erhalten. Die Ketten wurden nun chromatographisch getrennt und mit Mercaptan in die Thiolform übergeführt. Bei der Einwirkung von Luft auf die vereinigten Thiolketten wurde bis zu 50%^{3,4} Insulinaktivität regeneriert. Wesentlich geringere Insulinaktivitäten von 1—2% wurden von TSOU et al.⁵ erhalten, wenn die nach der Spaltung des Insulins mit Natrium in flüssigem Ammoniak freigelegten Thiolgruppen sowie die Imidazolstick-

stoffe benzyliert und die benzylierten Insulinketten dann mit Natrium in flüssigem Ammoniak wieder reduziert wurden. KATSOYANNIS⁶ hat daher mit Recht darauf hingewiesen, daß bei der Bildung von Insulin aus den benzylierten Ketten weniger Aktivität erhalten wird als bei der Rekombination von Ketten aus sulfitolysiertem Insulin.

Bei der Synthese von größeren Cystein-Peptiden hat sich die von DU VIGNEAUD⁷ eingeführte Benzylgruppe besonders zum Schutz der Thiole bewährt und wurde daher auch bei der Insulinsynthese verwendet, so daß die Abspaltung mit Natrium in flüssigem Ammoniak unvermeidbar war. Bei der Oxydation der in den vorangehenden Mitteilungen⁸ beschriebenen vollsynthetischen, S-benzylierten Ketten sollten daher nach der Abspaltung der Benzylgruppen maximal 1—2% Insulinaktivität erhalten werden. Für die Darstellung von Insulin aus synthetischen Kettenderivaten sind zwei Wege möglich: Einmal die Abspaltung der Schutzgruppen und direkte Luftoxydation der Thiolketten oder zum anderen deren Umwandlung in Bunesalz-Ketten und noch-

* 49. Mitt. über Peptide, 48. Mitt. vgl. J. MEIENHOFER u. E. SCHNABEL, voranstehend.

** Aus der Dissertation O. BRINKHOFF, T. H. Aachen, 1964. Die synthetischen Insulinketten wurden uns von den Herren Dr. H. BREMER und Dr. E. SCHNABEL überlassen.

¹ G. H. DIXON u. A. C. WARDLAW, *Nature* [London] **188**, 721 [1960].

² Y.-c. DU, Y.-s. SHANG, Z.-x. LU u. C.-L. TSOU, *Sci. Sinica* [Peking] **10**, 84 [1961].

³ R.-q. JIANG, Y.-c. DU u. C.-L. TSOU, *Sci. Sinica* [Peking] **12**, 452 [1963].

⁴ Y.-c. DU, R.-q. JIANG u. C.-L. TSOU, *Sci. Sinica* [Peking] **14**, 229 [1965].

⁵ C.-L. TSOU, Y.-c. DU u. G.-J. XÜ, *Sci. Sinica* [Peking] **10**, 332 [1961].

⁶ P. G. KATSOYANNIS, *Diabetes* **13**, 339 [1964].

⁷ V. DU VIGNEAUD, L. F. AUDRIETH u. H. S. LORING, *J. Amer. chem. Soc.* **52**, 4500 [1930].

⁸ H. ZAHN, H. BREMER u. R. ZABEL, *Z. Naturforschg.* **20 b**, 653 [1965]; J. MEIENHOFER u. E. SCHNABEL, *Z. Naturforschg.* **20 b**, 661 [1965].

malige Reduktion durch Mercaptane. Des letzteren Verfahrens bedienen sich KATSOYANNIS et al.⁹, NIU et al.¹⁰ sowie WANG et al.¹¹. Wir bevorzugten die einfachere Methode der gemeinsamen Reduktion mit Natrium in flüssigem Ammoniak und anschließender Oxydation bei p_H 9,0 oder 9,6 in Anlehnung an die Arbeit von TSOU et al.⁵.

1. Gemeinsame Abspaltung der Schutzgruppen von den synthetischen Kettenderivaten

Abb. 1 zeigt schematisch die aromatischen Schutzgruppen an der synthetischen A-Kette (oben), nämlich die *N*-terminale Carbobenzyloxy- und die vier *S*-Benzylgruppen sowie an der synthetischen B-Kette (unten) die *N*-terminale Carbobenzyloxygruppe, zwei *S*-Benzylgruppen, eine *N*^{im}-Benzyl- und zwei *N*-Tosylgruppen am Arginin in Position 22 und Lysin in Position 29.

Ein Gemisch aus äquimolaren Teilen geschützter synthetischer A-Kette und synthetischer B-Kette wurde in flüssigem Ammoniak gelöst. Die Reduktion mit Natrium nach DU VIGNEAUD et al.¹² wurde nach einem Vorschlag von RUDINGER durch einen Zusatz von Acetamid modifiziert. Überraschenderweise lösten sich die geschützten synthetischen Ketten glatt, und schon nach 30 Min. wurde kein Natrium mehr verbraucht. Zur Sicherheit wurde weitere 90 Min. eine leichte Blaufärbung aufrechterhalten. Das Ammoniak wurde durch Abdampfen im Vakuum entfernt, wobei ein lockeres Pulver zurückblieb, das aus den synthetischen Ketten in der Thiolform, anorganischen Salzen und Reaktionsprodukten der Spaltreaktionen bestand.

2. Luftoxydation des Thiolkettengemisches

Das Rohprodukt des Deblockierungs-Ansatzes wurde in Phosphatpuffer (p_H 9,0) gelöst und gegen

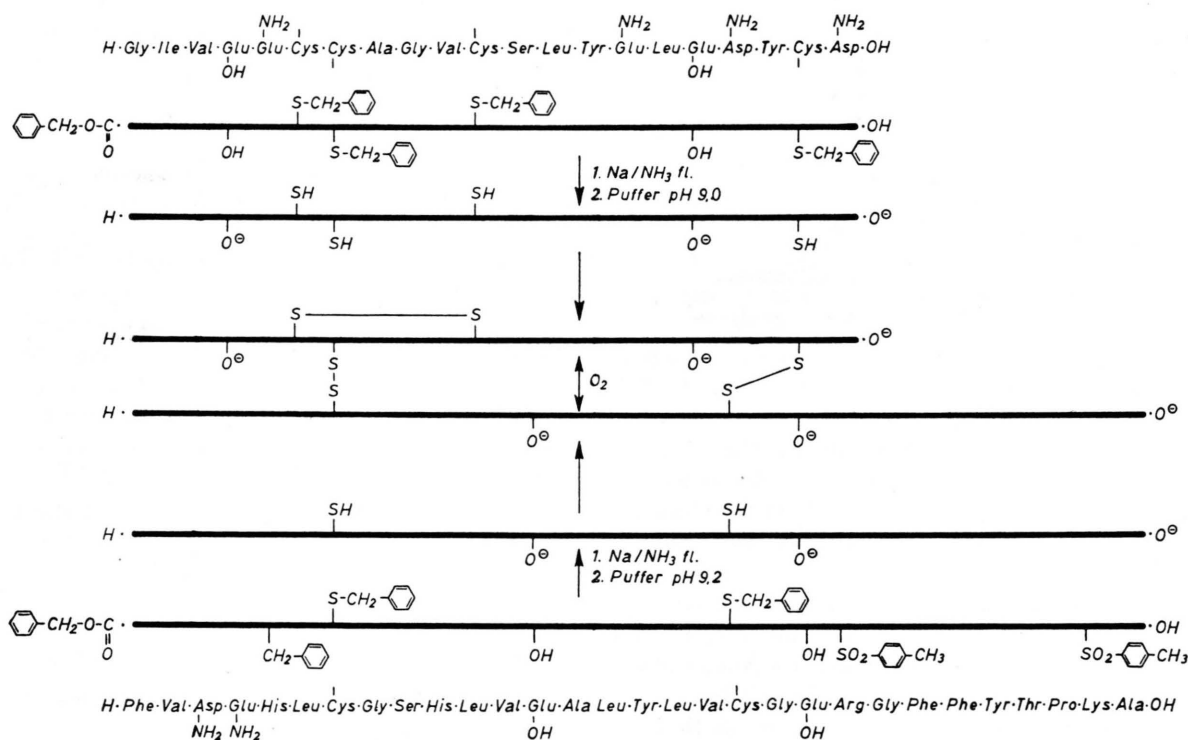


Abb. 1. Deblockierung und Verknüpfung der synthetischen Insulinketten.

⁹ P. G. KATSOYANNIS, A. TOMETSKO u. K. FUKUDA, J. Amer. chem. Soc. **85**, 2863 [1963]; P. G. KATSOYANNIS, K. FUKUDA, A. TOMETSKO, K. SUZUKI u. M. TILAK, **86**, 930 [1964].
¹⁰ C.-I. NIU, Y.-T. KUNG, W.-T. HUANG, L.T. KE, C.-C. CHEN, Y.-C. CHEN, Y.-C. DU, R.-Q. JIANG, C.-L. TSOU, S.-C. HU, S.-Q. CHU u. K.-Z. WANG, Sci. Sinica [Peking] **13**, 1343 [1964].

¹¹ Y. WANG, J.-Z. HSU, W.-C. CHANG, L.-L. CHENG, C.-Y. HSING, A.-H. CHI, T.-P. LOH, C.-H. LI, P.-T. SHI u. Y.-H. YIEH, Sci. Sinica [Peking] **13**, 2030 [1964].
¹² H. S. LORING u. V. DU VIGNEAUD, J. biol. Chemistry **111**, 385 [1935]; V. DU VIGNEAUD u. O. K. BEHRENS, **117**, 27 [1937]; R. H. SIFFERD u. V. DU VIGNEAUD, **108**, 753 [1935].

verdünnte Ammoniaklösung (p_H 9,0) dialysiert. Zur Beschleunigung der Oxydation wurde in die Ammoniaklösung Sauerstoff eingeleitet. Die Gefrier-trocknung des dialysierten Ansatzes lieferte in 83% Ausbeute ein weißes Pulver, das als 191 A bezeichnet wurde. In einem weiteren Versuch wurde das p_H der Ammoniaklösung auf 9,6 eingestellt. Die Ausbeute an so erhaltenem Präparat 191 B betrug 61% der Theorie.

Das UV-Spektrum des Präparates 191 A in 0,05-m. Ammoniumcarbonat-Lösung stimmt qualitativ mit dem einer Lösung von Insulin überein, doch ist der Proteingehalt des synthetischen Materials geringer (vgl. Abb. 2).

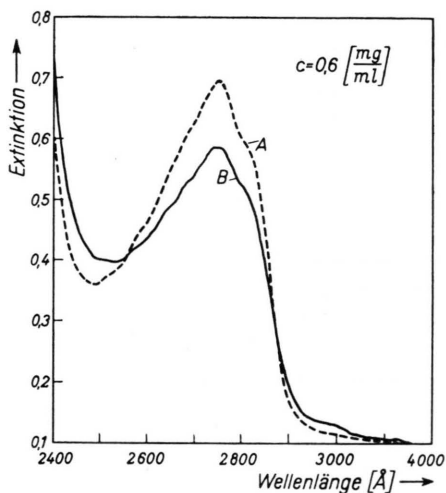


Abb. 2. UV-Spektrum der Probe 191 A und des nativen Insulins [0,05-m. $(NH_4)_2CO_3$ -Lösung, 1-cm-Küvetten, Beckman DK 2].

Papierelektrophoretisch zeigte die Hauptkomponente des Präparates 191 A – in Ameisensäure-Puffer bei p_H 1,9 gelöst – denselben Wanderungsweg wie Insulin unter den gleichen Bedingungen (vgl. Abb. 3).

Das synthetische Insulinpräparat enthält eine Nebenkomponente, die langsamer wandert und wahrscheinlich ein Oxydationsprodukt des Nonapeptides A 1–9 darstellt. Eine Aminosäureanalyse erübrigte sich, weil die beiden Ketten schon als Derivate auf ihre Aminosäure-Zusammensetzung geprüft worden waren, und weil nur die biologische Prüfung entscheiden konnte, ob die Oxydationsprodukte 191 A und B Insulin enthielten.

¹³ D. B. MARTIN, A. E. RENOLD u. Y. M. DAGENAIS, *Lancet* **2**, 76 [1958].

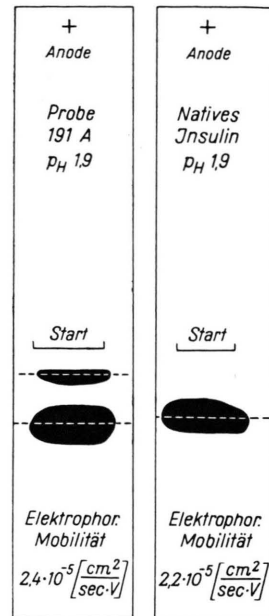


Abb. 3. Niederspannungs-Elektropherogramme der Probe 191 A und des nativen Insulins (Harnstoff-Ameisensäure-Puffer, p_H 1,9, Elphor-Gerät).

3. Biologische Prüfung der Präparate 191 A und 191 B

Beide Präparate wurden unverzüglich auf die Stimulierung der Aufnahme und des Abbaus von radioaktiv markierter Glucose durch epididymales Rattenfettgewebe nach MARTIN et al.¹³ mit einer modifizierten Methode nach DITSCHUNEIT et al.¹⁴ geprüft und die folgenden Ergebnisse erhalten:

| Protein-konzentration [mg/ml] | Probe 191 A | | Probe 191 B | |
|-------------------------------|-----------------------------------|---------------|-----------------------------------|---------------|
| | Aktivität im ml Lösung [μ E] | Aktivität [%] | Aktivität im ml Lösung [μ E] | Aktivität [%] |
| 0,16 | 4620 | 0,037 | 429 | 0,01 |
| 0,016 | 2890 | 0,67 | 25 | 0,0057 |
| 0,008 | 1320 | 0,61 | 965 | 0,45 |
| 0,0016 | 45 | 0,14 | 37 | 0,086 |

Tab. 1. Biologische Aktivität * der vollsynthetischen Proben 191 A und 191 B bei der radiochemischen Bestimmung am epididymalen Rattenfettgewebe. * Aktivitätsangaben ohne Korrektur bezogen auf natives Insulin mit 25 I.E. pro mg.

¹⁴ H. DITSCHUNEIT, J.-D. FAULHABER u. E. F. PFEIFFER, *Atompraxis* **8**, 172 [1962].

Die Kombinationsprodukte der deblockierten synthetischen Ketten wurden auch an der Maus¹⁵⁻¹⁹ (entsprechend der Beschreibung der Versuchsdurchführung nach BURN²⁰) auf Aktivität untersucht. Außerdem erfolgte die Prüfung am isolierten Rattenzwerchfell durch Untersuchung der Stimulation der Glucoseaufnahme durch das Präparat. Die erzielten Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

| Untersuchungen an Mäusen | | | |
|--|----------------|-----------------------|-----------------|
| Probe | Dosis/Tier | Tiere mit Krämpfen | Aktivität |
| 191 A | 2,8 E 5,6 E | 9 von 24 24 von 24 | etwa 0,5-1% |
| 191 B | 5,6 E | 0 von 24 | keine Aktivität |
| natives Insulin | 0,028 E | 16 von 24 | 100% |
| Glucoseaufnahme des isolierten Rattenzwerchfells ^{21, 22} | | | |
| Probe | | | Aktivität |
| 191 A | | | etwa 0,2% * |
| 191 B | | | unter 0,05% * |

Tab. 2. Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen der Proben 191 A und 191 B an der Maus und nach der Glucoseaufnahme des isolierten Rattenzwerchfells. * Bei diesem Test blieb ein Teil der Proben ungelöst.

Faßt man die Ergebnisse der biologischen Prüfungen zusammen, so kann festgestellt werden, daß Präparat 191 A Insulinaktivitäten zwischen 0,2 und 1,0%, entsprechend 0,05 bis 0,25 I.E./mg besaß, die durch Meerschweinchen-Antiserum gegen Schweineinsulin vollständig gehemmt wurden. Präparat 191 B dagegen zeigte nur bei sofortiger Prüfung eine ebenfalls hemmbare Aktivität zwischen 0,01 und 0,45% (Tab. 1), die schon einige Wochen später bei der Prüfung im Maus-Krampf test verschwunden war (Tab. 2). Da dieses Präparat aus denselben synthetischen Kettenderivaten gewonnen wurde, kann die geringere Aktivität nur auf den höheren p_H -Wert von 9,6 bei der Oxydation zurückgeführt werden. Aber auch das wirksame Präparat 191 A scheint nicht haltbar zu sein. Eine Wiederholung der biologischen Prüfung nach einem halben

Jahr mit Hilfe der radiochemischen Methode am Rattenfettgewebe ergab nur noch eine Aktivität von 0,1 Prozent.

Wie VOLFIN et al.²³ fanden, besitzen Oxydationsprodukte der Insulin-A-Kette allein bereits eine geringe Insulinaktivität. Diese kann nicht durch verschleppte B-Kette und damit regeneriertes Insulin hervorgerufen sein, da auch die hier benutzte synthetische Insulin-A-Kette nach Abspaltung der Schutz- und Oxydation der Thiolgruppen eine Insulinaktivität von 0,4-0,5% liefert. Bei einem Anteil von etwa 40% A-Ketten-Material in unserem Präparat 191 A könnte also eine Insulinaktivität bis zu 0,2% nur auf Oxydationsprodukte der Insulin-A-Kette zurückzuführen sein. Die beobachtete Aktivität liegt aber bei 0,5-1,0% und dürfte damit tatsächlich von synthetischem Insulin herrühren.

Beschreibung der Versuche

I. Kombination synthetischer A-Kette mit synthetischer B-Kette bei p_H 9,0

Z-Gly-Ile-Val-Glu-Glu(NH₂)-Cys(BZL)-Cys(BZL)-Ala-Gly-Val-Cys(BZL)-Ser-Leu-Tyr-Glu(NH₂)-Leu-Glu-Asp(NH₂)-Tyr-Cys(BZL)-Asp(NH₂) (33 mg) wurde vermischt mit Z-Phe-Val-Asp(NH₂)-Glu(NH₂)-His(BZL)-Leu-Cys(BZL)-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys(BZL)-Gly-Glu-Arg(Tos)-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys(Tos)-Ala (45 mg) und im Hochvakuum 5 Stdn. bei 105° über P₂O₅ getrocknet. Das getrocknete Gemisch wurde in wasserfreiem (über Natrium destilliertem) flüssigem Ammoniak (200 ml) gelöst, Acetamid (10 mg) zugegeben und mit kleinen Stücken Natrium behandelt. Nach 30 Min. wurde kein Natrium mehr verbraucht. Die Blaufärbung wurde weitere 90 Min. aufrechterhalten und dann durch Zugabe von Spuren Ammoniumchlorid entfernt. Nach Eindunsten des Ammoniaks auf etwa 30 ml wurde der Rest eingefroren und durch Gefriertrocknung entfernt. Das zurückgebliebene lockere Pulver wurde in 0,05-m. Phosphatpuffer, p_H 9,0, gelöst (40 ml) und im Visking 18/32-Dialysierschlauch bei 4 bis 8° gegen verdünntes Ammoniak, p_H 9,0, dialysiert. Die Außenflüssigkeit wurde mehrmals gewechselt und gelegentlich einige Min. lang Sauerstoff eingeleitet. Nach 15 Stdn. wurde die im Schlauch befindliche Lösung gefriergetrocknet. Ausbeute: 50 mg (83%, berechnet auf die geschützten Ketten) salzfreies, lockeres Pulver.

¹⁵ D. T. FRASER, J. Lab. clin. Med. **8**, 425 [1923].

¹⁶ H. LANGECKER u. W. STROSS, Biochem. Z. **161**, 295 [1925].

¹⁷ H. HORSTERS u. H. BRUGSCH, Z. exp. Med. **65**, 569 [1929].

¹⁸ A. M. HEMMINGSEN u. A. KROGH, Publication of the League of Nations. III. Health, 1926, 7, CH. 398, 40.

¹⁹ J. W. TREVAN u. E. BROOK, Publications of the League of Nations. III. Health, 1926, 7, CH. 298, 47.

²⁰ J. H. BURN, The principles of Therapeutics. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1957.

²¹ J. GROEN, C. E. KAMMINGE, A. F. WILLEBRANDS u. J. R. BLICKMAN, J. clin. Invest. **31**, 47 [1952].

²² J. VALLANCE-OWEN u. B. HURLOCK, Lancet **1**, 68 [1954].

²³ P. VOLFIN, A. M. CHAMBAUT, D. EBOUÉ-BONIS, H. CLAUSER, O. BRINKHOFF, H. BREMER, J. MEIENHOFER u. H. ZAHN, Nature [London] **203**, 408 [1964].

II. Kombination synthetischer A-Kette mit synthetischer B-Kette bei pH 9,6

33 mg geschützte A-Kette wurden mit 47 mg geschützter B-Kette wie bei I kombiniert, jedoch bei pH 9,6 oxydiert. Ausbeute 37 mg (61%).

III. Biologische Prüfung der Präparate 191 A und 191 B

1. Bestimmung der biologischen Aktivität am isolierten epididymalen Rattenfettgewebe

Die Insulinpräparate wurden bei pH 2 in verdünnter Salzsäure gelöst und durch Krebs-Ringer-Bicarbonat-Pufferlösung Verdünnungen mit einem Proteingehalt von 0,16; 0,016; 0,008 und 0,0016 mg/ml hergestellt. Die Wirkung dieser Verdünnungen auf die $^{14}CO_2$ -Bildung aus l-d- ^{14}C -Glucose wurde am isolierten epididymalen Rattenfettgewebe getestet und der Insulingehalt durch Vergleich mit der Wirkung von krist. Schweineinsulin (1000 und 50 $\mu E/ml$, spez. Aktivität 25 E/mg) ermittelt. Auf diese Weise wurde der Insulingehalt der verschiedenen Verdünnungen 16-fach mit jeweils 3 Fettzipfeln von 3 verschiedenen Ratten bestimmt und der Mittelwert berechnet. Im einzelnen wurde derart verfahren, daß immer nur je zwei Bestimmungen einer Protein-Verdünnung mit den Fettzipfeln von 3 Ratten erfolgten und die entsprechenden Standardinsulin-Lösungen aus krist. Insulin für diese zwei Restansätze mit den Fettzipfeln der gleichen Ratten getestet wurden (methodische Einzelheiten bei DITSCHUNEIT et al. ¹⁴).

2. Für die Untersuchungen an Mäusen wurden Gruppen von 24 15–20 g schweren Tieren, die vor Versuchsbeginn 16 Stdn. ohne feste Nahrung waren, herangezogen. Während des Versuches wurden sie bei 37° gehalten. Die Herstellung der Präparatlösungen er-

folgte unter Zuhilfenahme von einigen Tropfen normaler Essigsäure. Das Präparat 191 A wurde Gruppen von Tieren in einer Dosierung von 0,112 bzw. 0,224 mg/Tier subcutan appliziert; 191 B einer weiteren Gruppe in einer Dosierung von 0,224 mg/Tier [0,028 E/Tier natives Insulin (1 mg = 25 E) führen bei etwa der Hälfte der Versuchstiere zu hypoglykämischen Krämpfen. Die eingesetzten Dosen waren das Hundert- bzw. Zweihundertfache dieser Menge]. Nach der Substanzapplikation wurden die Mäuse 1 Stde. auf das Auftreten von Krämpfen beobachtet.

3. Zur Bestimmung der Glucoseaufnahme an isolierten Rattenzwerchfellen wurden diese im Warburg-Apparat zusammen mit den zu testenden Proben und Glucose in Bicarbonat-Pufferlösung inkubiert. Die Lösungen enthielten außerdem 500 γ/ml Serumalbumin. Nach zwei Stdn. bei 37° erfolgte die quantitative Auswertung der Glucoseaufnahme im Vergleich mit Insulinen bekannter Aktivität. Die synthetischen Insulinpräparate waren unter den Testbedingungen (50, 500, 2000 $\mu g/ml$) nur teilweise löslich; die gemessenen Aktivitäten liegen unter denen der anderen Bestimmungsmethoden.

Wir danken Herrn Prof. H. CLAUSER, Institut de Biochimie, Biophysique et Phyto-Physiologie, Universität Paris, für die Bestimmung der Glucoseaufnahme am isolierten Rattenzwerchfell. Dem Bundeswirtschaftsministerium, Bonn (Forschungsvorhaben 822), der Arbeitsgemeinschaft Industrieller Forschungsvereinigungen, Köln, sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, sei für die finanzielle Unterstützung der vorliegenden Arbeit gedankt. Der eine von uns (J. MEIENHOFER) möchte sich bei Herrn Dr. habil. R. WEGLER, Farbenfabriken Bayer, Werk Elberfeld, für die Freistellung zur Mitarbeit an diesem Forschungsprojekt bedanken.