

Zweikettiges Insulin aus einer einkettigen, verzweigten Depsipeptidvorstufe – das Ende einer langen Reise**

Hans-Jürgen Musiol und Luis Moroder*

Hormone · Insulin · Peptide · Proteinfaltung ·
Totalsynthesen

Bis hinein in die ersten Jahrzehnte des 20. Jahrhunderts verlief eine Diabeteserkrankung noch tödlich. Dementsprechend steht das Peptidhormon Insulin seit seiner Entdeckung im Jahr 1922 durch Banting und Best im Rahmen ihrer Experimente mit Extrakten aus der Bauspeicheldrüse von Hunden^[1] sowie dem Bekanntwerden seiner erstaunlichen pharmakologischen Wirkung bei der Diabetesbehandlung mit Rinderpankreas-Extrakten im Mittelpunkt medizinischer, chemischer, struktureller, immunologischer, biologischer und biotechnologischer Forschungen. Die Studien von Banting und Best bildeten den Ausgangspunkt für eine rekordverdächtige Zahl an wegweisenden Forschungen.^[2] Ungeachtet aller Fortschritte in der Insulinforschung im vergangenen Jahrhundert bleibt die Entwicklung neuer Insulinmedikamente eine bedeutende Aufgabe; wesentliche Ziele bestehen in einer höheren Wirksamkeit und Sicherheit des Medikaments und in einer verbesserten Therapietreue der Patienten.

Bereits 1923, nur ein Jahr nach der Entdeckung dieses Peptids/Miniproteins, brachte Hoechst das erste industriell aus Rinder- und Schweinepankreas-Extrakten hergestellte Insulin für die Behandlung von Diabetes auf den Markt. Die Reinheit dieser Insulinpräparate und die Reproduzierbarkeit ihrer Herstellung wurden stetig verbessert, bis hin zur Isolierung eines ersten kristallinen Insulin-Zink-Komplexes mit verlängerter Wirkdauer im Jahr 1936. Während des Zweiten Weltkrieges nahm die Insulinproduktion drastisch ab und erholte sich in der Nachkriegszeit nur langsam; schließlich aber ebnete 1955 die Veröffentlichung der Insulin-Primärstruktur durch Sanger und Mitarbeiter^[3] den Weg zur Synthese dieses Moleküls und eröffnete so einen alternativen Zugang zu diesem unverzichtbaren Wirkstoff. Dabei waren die Totalsynthesen von Oxytocin und Vasopressin durch Du Vigneaud und Mitarbeiter im Jahr 1954^[4] und die hierfür entwickelte Cysteinchemie wegbereitend.

Das humane Insulinmolekül besteht aus zwei Peptidketten: Eine aus 21 Aminosäuren bestehende A-Kette, die eine intramolekulare Disulfidbrücke aufweist, ist durch zwei weitere, intermolekulare Disulfidbrücken mit einer B-Kette aus 30 Aminosäuren verknüpft (Abbildung 1).^[5] Auf Grundlage vorheriger Experimente zur Rückgewinnung der Insulinak-

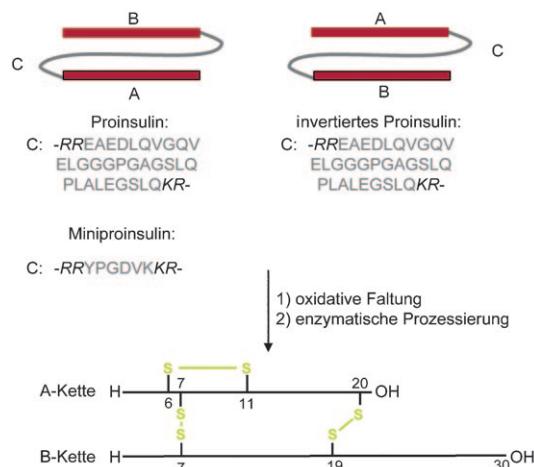


Abbildung 1. Umwandlung von nativem und nichtnativem (invertiertem) Proinsulin in Insulin.

tivität aus den getrennten, inaktiven natürlichen A- und B-Ketten unter oxidativen Bedingungen^[5] wurden in den frühen 1960er Jahren die ersten Totalsynthesen von Insulin entwickelt: Die Laboratorien von Zahn,^[17a] Katsoyannis^[17b] und der Shanghai Insulin Research Group^[17c] nutzten die oxidative Faltung von synthetischen A- und B-Ketten, um biologisch wirksames Insulin herzustellen, allerdings nur in sehr geringen Ausbeuten. Diese geringen Ausbeuten an natürlichem Disulfidisomer bildeten das größte Hindernis bei der Totalsynthese von Insulin durch den Zwei-Ketten-Ansatz. Zwar konnte das Verfahren durch den Einsatz von S-Sulfonatketten-Intermediaten sowie eine weitere Verfeinerung der $\text{SSO}_3\text{H}/\text{SH}$ -Kombinationsstrategie verbessert werden,^[6] seine Einschränkungen erschweren jedoch die Anwendung auf Struktur-Funktions-Untersuchungen, die grundlegend für eine Verbesserung der pharmakologischen Wirkung des Moleküls sind.

[*] H.-J. Musiol, Prof. L. Moroder
Max-Planck-Institut für Biochemie
82152 Martinsried (Deutschland)
Fax: (+49) 898-578-2847
E-Mail: moroder@biochem.mpg.de
Homepage: www.biochem.mpg.de/en/rg/moroder/

[**] Wir danken Dr. Gerhard Müller (Proteros Fragments GmbH, Martinsried) für die kritische Durchsicht des Manuskripts und seine Hilfe bei der Erstellung der Abbildungen.

Eine Umgehung der problematischen oxidativen A- und B-Kettenverknüpfung wurde durch entscheidende Fortschritte in der Peptidchemie möglich (orthogonale Schutzgruppenstrategien, Kupplungsverfahren und insbesondere die Thiolchemie zur Synthese cystinreicher Peptide in Lösung und an festen Trägern). Eine regioselektive Strategie zur Cysteinkupplung nach Sieber und Mitarbeitern (Ciba-Geigy)^[18a] ermöglichte die schrittweise Verknüpfung von Fragmenten unter gleichzeitiger Bildung der inter- und intramolekularen Disulfidbrücken. Diese Synthesestrategie eröffnete sogar den Zugang zu nichtnativen Disulfidisomeren des Insulins, die die Bedeutung der nativen Cystein-Verknüpfungen für ein korrekt gefaltetes, bioaktives Hormon bestätigten. In den frühen 1990er Jahren schließlich wurden von Kiso und Mitarbeitern regioselektiv die Disulfidbrücken zwischen den vollsynthetischen A- und B-Ketten gebildet, wobei paarweise orthogonal zueinander stehende Thiolschutzgruppen eingesetzt wurden, die eine schrittweise Einführung der inter- und intramolekularen Disulfidbrücken unter Bildung des nativen Insulinisomers ermöglichten.^[18b] Zwar lieferten diese beiden Syntheseverfahren Insulin mit hoher Reinheit, allerdings war die Gesamtausbeute weiterhin unbefriedigend. Die geringen Ausbeuten wie auch der große Zeit- und Arbeitsaufwand dieser vom akademischen Standpunkt aus betrachtet brillanten Synthesen bleiben ein Haupthindernis für die Entwicklung von Insulinanaloga in den benötigten Ausbeuten, die für eine vollständige biochemische, biologische und pharmakologische Charakterisierung benötigt werden.

Man erwartete, dass das in den letzten Jahrzehnten erworbene Wissen um die Biosynthese des Insulins und dessen biotechnologische Produktion durch rekombinante DNA-Techniken eine Lösung für dieses Problem liefern könnte.^[2a,c] Die ribosomale Synthese des Insulins erfolgt in den pankreatischen β -Zellen, wo zunächst einkettiges Präproinsulin gebildet wird. Dieses besteht aus einem Signalpeptid am N-Terminus der B-Kette, die über eine so genannte C-Peptidsequenz mit dem N-Terminus der A-Kette verknüpft ist (Abbildung 1). Nach dem enzymatischen Abspalten des Signalpeptids im endoplasmatischen Reticulum faltet sich das B-C-A-Proinsulin mithilfe von Faltungskatalysatoren und ergibt so letztlich durch Einwirkung von Prohormon-Konvertasen das reife, zweikettige Insulin.^[7a] Die oxidative Faltung des Proinsulins in das native Disulfidisomer erfolgt mit hoher Effizienz (bis zu 80%) sogar *in vitro*, und die Umwandlung in das reife Insulin kann mit Trypsin und Carboxypeptidase B (Abbildung 1) erzielt werden.^[7b] Inspiriert durch die Röntgenkristallstruktur von Insulin,^[8] die eine räumliche Nähe des N-Terminus der A-Kette zum C-Terminus der B-Kette erkennen lässt, wurden erste Versuche einer Vernetzung der beiden Ketten zwischen N^ε-Lys^{B29} und N^α-Gly^{A1} mit spaltbaren und nichtspaltbaren difunktionellen Reagentien durchgeführt, um einkettige Proinsulinanaloga herzustellen.^[9] Die Tatsache, dass sich die im nativen Insulin vorhandenen Disulfidbrücken in hohen Ausbeuten zurückgewinnen ließen, zeigte deutlich, dass das C-Peptid lediglich als eine Art „Leine“ zwischen den beiden Ketten wirkt und nicht den oxidativen Faltungsprozess steuert. Die einfache Rolle des C-Peptids wurde auch bestätigt, indem diese lange native Verknüpfungssequenz durch ein nichtnatives Mini-C-

Peptid ersetzt wurde, das für höhere Ausbeuten bei der oxidativen Faltung der linearen (durch sekretorische Expression in *S. cerevisiae* produzierten) Vorstufen und bei deren anschließender Umwandlung in das reife Insulin optimiert war (Abbildung 1).^[2c] Sogar invertiertes Proinsulin faltet sich in hoher Ausbeute korrekt, mit dem Vorteil, dass es bereits signifikant aktiver als das fast inaktive Proinsulinmolekül ist (Abbildung 1).^[10]

Heute werden biotechnologische Verfahren, die auf Proinsulin und verschiedenen optimierten Miniproinsulinen beruhen, für die kommerzielle Insulinproduktion in *E. coli* bzw. in *S. cerevisiae* genutzt; in der chemischen Insulinsynthese haben derartige lineare Peptidvorstufen aufgrund von Löslichkeitsproblemen dagegen nur sporadische Anwendung gefunden. Diese Probleme konnten nur umgangen werden, indem z. B. N-terminale Verlängerungen mit löslichkeitsvermittelnden Sequenzen angebracht wurden.^[11] Die daraus resultierende Größe der Peptidvorstufen erschwert jedoch die Gewinnung von hochreinen Vorstufen in Mengen, wie sie für eine effiziente Faltung und die anschließende enzymatische Prozessierung zu Insulin benötigt werden. Erste Versuche zur Lösung dieses Problems stammen von Kent und Sohma;^[12] diese entwickelten eine biomimetische Synthese von Miniproinsulinen durch Oximverknüpfung synthetischer A- und B-Kettenderivate. Diese Derivate enthalten an ausgewählten Positionen zwei peptidische Verlängerungen mit reaktiven Gruppen für eine Verknüpfung der beiden Ketten zwischen N^α-Gly^{A1} und N^ε-Lys^{B28} oder N^α-Phe^{B1} sowie zwischen C^α-Thr^{B30} und N^α-Gly^{A1}. Nur die letztgenannte, klassische, Proinsulin-ähnliche Verknüpfungsweise führte zur korrekten Bildung der Disulfidbrücken zwischen der A- und der B-Kette bei der oxidativen Faltung und, durch anschließende enzymatische Prozessierung, zum gewünschten Insulinmolekül in befriedigenden Ausbeuten.

Die Insulinvariante, die eine invertierte Pro^{B28},Lys^{B29}-Sequenz (d. h. Lys-Pro) enthält, zeigte eine deutlich verringerte Aggregationstendenz und eine schnell eintretende pharmakokinetische Wirkung.^[13] Wegen dieser vorteilhaften Eigenschaften wurde das Lys^{B28},Pro^{B29}-Insulin das erste kommerziell registrierte Insulinanalogon als aktiver Bestandteil von Humalog (Eli Lilly & Co).^[2a] Die räumliche Nähe der β -Hydroxygruppe des Thr^{B30}-Restes zur γ -Carboxygruppe des Glu^{A4}-Restes in der Kristallstruktur (Abbildung 2)^[14] regte

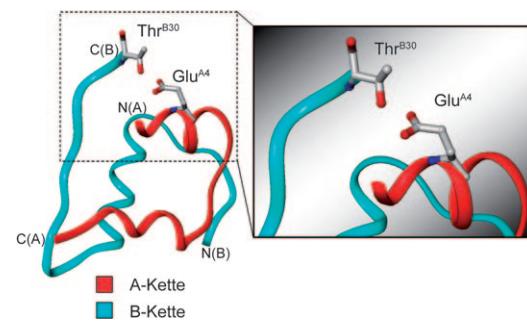


Abbildung 2. Links: Bänderdarstellung der beiden Ketten von Lys^{B28},Pro^{B29}-Insulin (PDB-Code: 1LPH) mit den Glu^{A4}- und Thr^{B30}-Resten. Rechts: Der vergrößerte Ausschnitt der C-terminalen Region der B-Kette, C(B), in Nachbarschaft zur N-terminalen Region der A-Kette, N(A), belegt die unmittelbare Nähe der Glu^{A4}- und Thr^{B30}-Reste.

Kent und Mitarbeiter dazu an, eine Esterverknüpfung zwischen der A- und B-Kette einzuführen, um eine neuartige, einkettige Insulinvorstufe zu produzieren, der eine peptidische oder nichtpeptidische C-Peptid-ähnliche Verknüpfung komplett fehlt.^[15] Zudem war bekannt, dass die Löslichkeit von Peptiden mit einer hohen Aggregationsneigung deutlich von der Einführung von Depsipeptidbindungen profitiert.^[16] Indem dieser Vorteil genutzt wurde, konnte mithilfe moderner chemischer Ligationsmethoden das einkettige, verzweigte Depsipeptid trotz dessen erheblicher Größe ohne Löslichkeitsprobleme synthetisiert werden (Abbildung 3). In Einklang mit dem Designprinzip von Kent et al. enthält das Produkt die Depsipeptideinheit zwischen dem C-Terminus der B-Kette und der Carboxygruppe von Glu^{A4}. Überra-

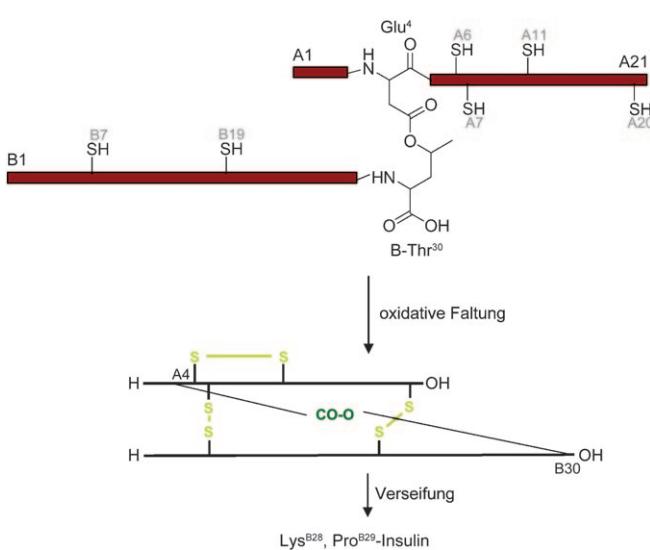


Abbildung 3. Umwandlung der verzweigten, synthetischen Peptidvorstufe in das Lys^{B28}, Pro^{B29}-Insulin.

schend verlief die oxidative Faltung in die korrekte Disulfidtopologie des Insulins in Ausbeuten, die jenen des Proinsulins vergleichbar sind, und der letzte chemische Verseifungsschritt mit Natriumhydroxid erfolgte ohne signifikante Nebenreaktionen. Man darf sogar erwarten, dass dieser letzte Schritt von einer weniger drastischen Verseifungsprozedur als der angewendeten alkalischen Hydrolyse profitieren wird.

Mit der Syntheseroute von Kent und Mitarbeitern könnte eine mehrere Jahrzehnte währende Reise hin zu einer effizienten Totalsynthese des Insulins nun an ihrem Ende angefangen sein. Das neue Verfahren bietet einen mühelosen und effizienten Zugang zu Insulinanaloga mit einer praktisch unbegrenzten Zahl und Diversität von nichtnatürlichen Aminosäureresten. Solche Analoga könnten es ermöglichen, die Potenz und Bioverfügbarkeit lebensrettender Insulinmedikamente zu verbessern sowie ihre Wirkung zeitlich zu verlängern oder mithilfe von Propharmaka zu steuern.

Eingegangen am 18. Mai 2010
Online veröffentlicht am 16. August 2010

- [1] a) F. G. Banting, C. H. Best, *J. Clin. Med.* **1922**, *7*, 251–266; b) F. G. Banting, C. H. Best, *J. Clin. Med.* **1922**, *7*, 464–472; c) F. G. Banting, C. H. Best, J. B. Collip, W. R. Campbell, A. A. Fletcher, *Can. Med. Assoc. J.* **1922**, *7*, 141–146.
- [2] Übersichtsartikel über Synthesen, Semisynthesen und biotechnologische Verfahren: a) J. P. Mayer, F. Zhang, R. D. DiMarchi, *Biopolymers* **2007**, *88*, 687–713; b) J. D. Wade in *Oxidative Folding of Peptides and Proteins* (Hrsg.: J. Buchner, L. Moroder), Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2009**, S. 345–366; c) T. Kjeldsen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *54*, 277–286.
- [3] A. P. Ryle, F. Sanger, L. F. Smith, R. Kitai, *Biochem. J.* **1955**, *60*, 541–556.
- [4] V. Du Vigneaud, C. Ressler, J. M. Swan, C. W. Roberts, P. G. Katsoyannis, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 3115–3121.
- [5] H. Dixon, A. C. Wardlaw, *Nature* **1960**, *188*, 721–724.
- [6] R. E. Chance, J. A. Hoffmann, E. P. Kroeff, M. G. Johnson, E. W. Schirmer, W. W. Bromer, M. J. Ross, R. Wetzel in *Peptides, Synthesis Structure and Function*, 7th American Peptide Symposium (Hrsg.: D. H. Rich, E. Gross), **1981**, S. 721–728.
- [7] a) D. F. Steiner, D. Cunningham, L. Spiegelman, B. Aten, *Science* **1967**, *157*, 697–700; b) D. F. Steiner, J. L. Clark, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1968**, *60*, 622–629.
- [8] a) M. J. Adams, T. L. Blundell, E. J. Dodson, G. G. Dodson, M. Vijayan, E. N. Baker, M. M. Harding, D. C. Hodgkin, B. Rimmer, S. Sheat, *Nature* **1969**, *224*, 491–495; b) E. N. Baker, T. L. Blundell, J. F. Cutfield, S. M. Cutfield, E. J. Dodson, G. G. Dodson, D. M. C. Hodgkin, R. E. Hubbard, N. W. Isaacs, C. D. Reynolds, K. Sakabe, N. Sakabe, N. M. Vijayan, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **1988**, *319*, 369–456.
- [9] a) A. Wollmer, D. Brandenburg, H.-P. Vogt, W. Schermerzki, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1974**, *355*, 1471–1476; b) R. Obermeier, R. Geiger, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1975**, *356*, 1631–1634; c) W.-D. Busse, F. H. Carpenter, *Biochemistry* **1976**, *15*, 1649–1657.
- [10] W. F. Heath, R. M. Belagaje, G. S. Brooke, R. E. Chance, J. A. Hoffmann, H. B. Long, S. G. Reams, C. Roundtree, W. N. Shaw, L. J. Sliker, K. L. Sundell, R. D. DiMarchi, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 419–425.
- [11] A. P. Tofteng, K. J. Jensen, L. Schäffer, T. Hoeg-Jensen, *Chem-BioChem* **2008**, *9*, 2989–2996.
- [12] Y. Sohma, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16313–16318.
- [13] D. N. Brems, L. A. Alter, M. J. Beckage, R. E. Chance, R. D. DiMarchi, L. K. Green, H. B. Long, A. H. Pekar, J. E. Shields, B. H. Frank, *Protein Eng.* **1992**, *6*, 527–533.
- [14] E. Ciszak, J. M. Beals, B. H. Frank, J. C. Baker, N. D. Carter, G. D. Smith, *Structure* **1995**, *3*, 615–622.
- [15] Y. Sohma, Q.-X. Hua, J. Whittaker, M. A. Weiss, S. B. H. Kent, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5621–5625; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5489–5493.
- [16] Übersichtsartikel: a) Y. Sohma, T. Yoshiya, A. Taniguchi, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, *Biopolymers* **2007**, *88*, 253–262; b) I. Coin, *J. Pept. Sci.* **2010**, *16*, 223–230.
- [17] a) J. Meienhofer, E. Schnabel, H. Bremer, O. Brinkhoff, R. Zabel, W. Sroka, T. H. Klostermeyer, D. Brandenburg, T. Okuda, H. Zahn, *Z. Naturforsch. B* **1963**, *18*, 1120–1121; b) P. G. Katsoyannis, K. Fukuda, A. Tometsko, K. Suzuki, M. Tilak, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 930–932; c) Y. T. Kung, Y. C. Du, W. T. Huang, C. C. Chen, L. T. Ke, S. C. Hu, R. Q. Jiang, S. Q. Chu, C. I. Niu, J. Z. Hsu, W. C. Chang, L. L. Cheng, H. S. Li, Y. Wang, T. P. Loh, A. H. Chi, C. H. Li, P. T. Shi, Y. H. Yieh, K. L. Tang, C. Y. Hsing, *Sci. Sinica* **1965**, *14*, 1710–1716.
- [18] a) P. Sieber, B. Kamber, A. Hartmann, A. Jöhl, B. Riniker, W. Rittel, *Helv. Chim. Acta* **1974**, *57*, 2617–2621; b) K. Akaji, K. Fujino, T. Tatsumi, Y. Kiso, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11384–11392.