

# NEUSYNTHESE DES RINDERINSULIN-B-KETTEN-S-SULFONATES

G. LOSSE, H. STANGE, B. SCHWENZER und W. NAUMANN  
 Sektion Chemie der Technischen Universität Dresden, DDR 8027 Dresden, Mommsenstr. 13, DDR

(Received in Germany 21 October 1977; Received in the UK for publication 9 March 1978)

**Zusammenfassung**—Eine neue Synthese der Rinderinsulin-B-Kette in der blockierten Form (7)\* mit  $\text{N}^{\text{H}}\text{-Trt-Cys-SEt}$ ,  $\text{N}^{\text{G}}\text{-H}^{\oplus}$ -sowie Benzyl-Schultz in den übrigen Positionen aus den Teilstücken 1-4 wird beschrieben. Ihre Deblockierung ist wahlweise mit HF,  $\text{HBr}/\text{TFE}$  bei  $\text{C}_2\text{H}_5\text{SH}$ -Addition sowie unter speziellen Bedingungen auch durch katalytische Hydrierung möglich. Bezuglich Ausbeute und Homogenität des Endproduktes lieferten die  $\text{HBr}/\text{TFE}$ -Acidolyse und die Hydrogenolyse die besten Ergebnisse. Hierdurch werden aus der geschützten Kette in guter Ausbeute Buntesalze mit gleicher insulinbildender Potenz wie solche nativer Herkunft gewonnen.

**Abstract**—A novel synthesis of the bovine insulin B chain in the blocked form (7) applying  $N^{10}$ -Trt-, Cys-SEt-,  $N^G$ -H $^{\oplus}$ - and Benzyl-protection in the residual positions is described starting from the partial fragments 1–4. By choice the deprotection is possible by HF, HBr/TFE with  $C_2H_5SH$  addition and also under special conditions by catalytic hydrogenolysis. HBr/TFE acidolysis and hydrogenolysis lead to the best resultates in respect to yield and homogeneity of the final product. Thus Bunte salts are received in good yield related to the protected B chain and with the same insulin forming potency as such of native provenience.

Die neueren Fragmentsynthesen der Insulin-B-Kette<sup>1</sup> verfolgen vorrangig das Ziel, durch geeignete Schutzgruppenauswahl an den Seitenketten der taktisch entscheidenden Aminosäuren His, Cys und Arg destruktive Deblockierungsbedingungen wie z.B. die Na/NH<sub>3</sub>-Spaltung im Endstadium zu umgehen und diesen Schritt möglichst schonend zu gestalten. So verwendet Katsoyanis<sup>2</sup> die Kombination N<sup>fm</sup>-Tos (temporär), Cys-Bzh und N<sup>Q</sup>-NO<sub>2</sub>, was Freisetzung der B-Kette mit HF ermöglicht, sowjetische Autoren<sup>3</sup> bauten zurückgreifend auf Arbeiten von Zahn<sup>4</sup> die Kette unter Cys-Eigenschutz als polymeres Disulfid auf, wodurch die Anwendung von HBr/TFE in der Endstufe erlaubt ist.

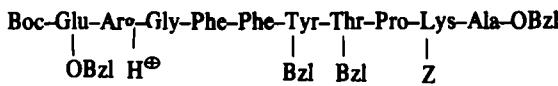
Wir beschreiben nachfolgend eine neue Synthese der Rinderinsulin-B-Kette in der geschützten Form (7, Schema 1). Dabei sind die  $N^{im}$ -Positionen durch den Tritylrest abgedeckt, um hier Nebenreaktionen bei DCC abhängigen Kupplungsschritten sicher auszuschliessen,<sup>5</sup> für den Thiolschutz des Cysteins wählten wir die S-Äthylmercaptopropgruppe. Wie wir früher zeigen konnten,<sup>6,7</sup> sind beide Substituenten bei Abspaltung  $N^a$ -ständiger Boc-Gruppen mit 4 n HCl in Dioxan bzw. 4 n HCl in Dioxan in Gegenwart von überschüssigem Äthylmercaptan völlig stabil. Unter anderen  $N^a$ -Boc-Deblockierungsbedingungen sowie bei *tert*. Butyl-ester-Acidolysen zeigt die S-Äthylmercaptopropgruppe dagegen deutlichen Disulfidaustausch,<sup>8</sup> so dass vor der Anwendung dieser Gruppe ohne die genannten Vorsichtsmaßnahmen gewarnt werden muss.

Für die Blockierung der  $\text{N}^{\text{G}}$ -Position entschieden wir uns für Protonierung, da andere hier gebräuchliche  $\text{N}^{\text{G}}$ -Schutzgruppen in Gegenwart von Cystein-Schwefel ausschliesslich HF- oder  $\text{Na}/\text{NH}_3$ -sensitiv sind. In den übrigen Positionen der Gesamtkette werden Schutzgruppen des Benzyltyps verwendet, um die einzelnen

Kupplungs- und Kondensationsschritte vorzugsweise mit leicht zugänglichen N<sup>α</sup>-Boc-Derivaten ausführen zu können. Diese Schutzgruppenanordnung erlaubt es erstmalig, die Deblockierung der Gesamtkette disponibel unter Heranziehung verschiedener Spaltreagenzien auszuführen und damit an einem höheren einheitlichen Polypeptid unabhängig von dessen Aufbaukonzeption einen zuverlässigen Methodenvergleich zu führen.

Die Synthese geht von den früher beschriebenen<sup>6-9</sup> Teilstücken (1)-(4) aus, welche durch der jeweiligen Kupplungssituation adaptierte Methodenauswahl erhalten und unter denen (2)-(4) direkt in carboxylfreier, kondensationsfähiger Form aufgebaut werden. Hierdurch werden alkalische oder acidolytische Ester-spaltungen im fortgeschrittenen Stadium der Synthese vermieden. Im Teilstück 1-8 erbringt der  $N^{1m}$ -Tritylrest

(1)



Bo



### Boc-21-30-OBzl<sup>9</sup>

(2) Boc-Lys-Tyr-Lys-Val-Cys-Gly-OH



(3) Boc-Ser-His-Lys-Val-Glu-Ala-OH



### Boc-9-14-OH<sup>+</sup>

(4) Z-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-OH



Z-1-8-0H<sup>6</sup>

\* Abkürzungen nach den Regeln der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 348, 256 (1967); *J. Biol. Chem.* 247, 977 (1972); ferner bedeutet TFE = Trifluoressigsäure, DCC = Dicyclohexylcarbodiimid, HOBT = 1-Hydroxybenzotriazol.

in Verbindung mit der N<sup>α</sup>-Z-Gruppe eine beträchtliche Hydrophobierung, wodurch in der Schlussphase der Synthese eine deutliche Löslichkeitsverbesserung erreicht und der Einsatz z.B. hydrophobierender Amidschutzgruppen in diesem Sequenzabschnitt entbehrlich wird.

Schema 1 gibt den Aufbau wieder: Das Teilstück (1) wurde in N<sup>α</sup>-Hydrochloridform eingesetzt und nach Abspaltung der N<sup>α</sup>-Boc-Gruppe mit HCOOH die Aminokomponente (1a) isoliert. Deren Kondensation mit dem Teilstück (2) führt zum Boc-Hexadecapeptid-derivat 15-30 (5), das durch Deblockierung mit 4 n HCl/Dioxan in Gegenwart von C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>SH in die Aminokomponente (5a) übergeführt wird. Alternativ lässt sich diese bequem auch aus (1a) und der N<sup>α</sup>-Bpoc-Form des Teilstückes 15-20 darstellen.<sup>10</sup> Die weitere Verlängerung zum H-Docosapeptid 9-30 (6a) wurde analog ausgeführt und schliesslich Komponente (4) zur vollen B-Kette an kondensiert. In den Schnittstellen 20/21 und 8/9, wo Disponibilität in der Auswahl der Aktivierungsmethoden gegeben war, wurden mehrere Aktivestervarianten sowie die DCC- und DCC/HOBt-Methode geprüft, wobei die DCC/HOBt-Kombination die besten Resultate erbrachte. Diese gleichzeitig racemisierungsarme Methode bot sich daher auch für die Schnittstelle 14/15 an. In den einzelnen Kondensationsschritten erfolgte die Abtrennung überschüssiger Carboxylkomponente mit 0.3 n NH<sub>4</sub>OH, Reste der Aminokomponenten wurden mit 5%iger KHSO<sub>4</sub>-Lösung entfernt. Das so chromatographisch rein gewonnene B-Kettenderivat enthielt den theoretisch geforderten Äquivalent-Gehalt an SEt-Gruppen, zeigte negative Pauly-Reaktion und lieferte befriedigende Elementar- und Aminosäureanalysen.

Zur Deblockierung haben wir einzelne Substanzproben der so gewonnenen B-Kette der HF- und HBr/TFE-Acidolyse unterworfen. Gleichzeitig wurde untersucht, inwieweit in Gegenwart von S die Schutzgruppen einer Hydrogenolyse zugänglich sind. Bei den Acidolysereaktionen erwies sich wiederum<sup>6,8</sup> ein Zusatz von überschüssigem C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>SH als zweckmässig, wodurch partieller, zu B-Ketten-Oligomeren führender Disulfidaustausch unterbunden und bei der nachfolgenden oxidativen Sulfitolyse<sup>11</sup> ein von schwerlöslichen, aus-

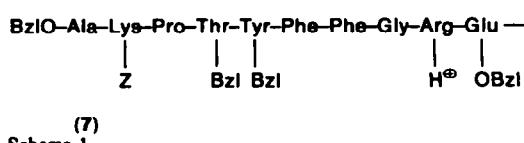
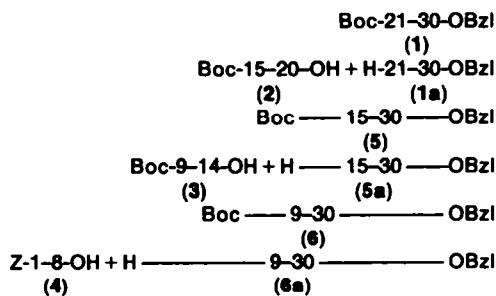
beutevermindernden Anteilen freies Deblockierungsprodukt erhalten wird.

Obwohl bei der hydrogenolytischen Abspaltung von Schutzgruppen an S-Peptiden bisher nur graduelle Erfolge erhalten wurden, glatt gelang lediglich die Entfernung von Z-Gruppen an niederen Methioninpeptiden,<sup>12</sup> griffen wir die Frage an der Insulin-B-Kette erneut auf, da die hier gewählte Schutzgruppenanordnung eine besonders günstige Ausgangssituation erwarten liess. So ist die Löslichkeit der geschützten Kette durch die zahlreichen hydrophobierenden Reste in DMF gut, was hohe Substratkonzentrationen an der Katalysatoroberfläche ermöglicht und damit die Hydrierfähigkeit auch eines höheren Peptides versprach. Zudem ist die Abspaltung der hier zum S-Schutz verwendeten SEt-Gruppe während der Hydrierungsreaktion nicht unbedingt erforderlich, da sie komplikationslos im nachfolgenden Sulfitolyseschritt entfernt wird. So reduziert sich das Problem ausschliesslich auf die Abtrennung von Benzyltyp-Schutzgruppen in Gegenwart von Cystein-Schweifel.

Wie sich zeigte, lässt sich eine H<sub>2</sub>-Aufnahme in der Tat unter energischen Bedingungen, d.h. bei einer Hydrierzeit von ca. 10 Tagen, 60°C und wiederholten Zusatz von frischem Palladium erreichen, wenn gleichzeitig 10 Äquivalente BF<sub>3</sub>-Ätherat<sup>13</sup> im Reaktionsgemisch vorhanden sind. Auf diese Weise werden negative Ellman- und positive Pauly-Reaktion aufweisende, von Ausgangsverbindung freie Hydrierungsprodukte erhalten, die nach der oxidativen Sulfitolyse im Dünnschichtchromatogramm jedoch noch zwei mit authentischem Buntessalz nicht identische Flecke aufweisen.

Behandelt man das Hydrierungsprodukt noch zusätzlich 1 h mit 0.2 n NaOH, so ergibt sich nach dem Sulfitolyseschritt dagegen ein chromatographisch und elektrophoretisch weitgehend homogenes Buntessalz (Abb. 1). Somit werden unter den genannten Hydrogenolysebedingungen alle Gruppen, ausgenommen SEt- und restliche Anteile der schwer hydrierbaren Benzylester entfernt, wobei auch ein partieller BF<sub>3</sub>-Ätherat-katalysierter Übergang der letzteren in Äthylester nicht ausgeschlossen ist.

Wie an anderer Stelle noch ausführlicher berichtet



Schema 1.

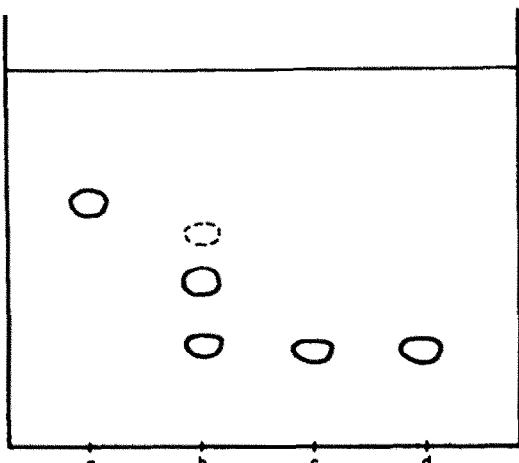


Abb. 1. Dünnschichtchromatographische Kontrolle der hydrolytischen Deblockierung der geschützten B-Kette (7) (n-Propanol/NH<sub>3</sub> = 7:3 auf Kieselgel H Merck). a = geschützte Kette, b = Hydrierungsprodukt, c = Hydrierungsprodukt nach Behandlung mit 0.2 n NaOH, d = authentische B-Kette, (b-d als S-Sulfonat).

wird,<sup>14</sup> zeigten generell die HBr/TFE-Acidolyse und die Hydrogenolyse gegenüber der HF-Spaltung bezüglich Ausbeute und Homogenität des erhaltenen Buntesalzes deutliche Vorteile.

Das durch HBr/TFE-Acidolyse unter Zusatz von Äthylmercaptan und Anisol gewonnene Deblockierungsprodukt wurde in 8 m Harnstoff bei pH 8.6 mit Tetrathionit/Sulfit sowie anschliessender Dialyse und Lyophilisation mit 90% iger Ausbeute in das rohe Buntesalz überführt. Nach Vorreinigung in 0.05 m NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung über Sephadex G 15 erfolgte dann Chromatographie an CM-Cellulose. Die Fraktionen unter dem Hauptpeak wurden erneut dialysiert und über Sephadex G 50 mit 1 m Essigsäure als Elutionsmittel feingereinigt.

Nach Lyophilisation konnte so das synthetische Rinderinsulin-B-Ketten-S-Sulfonat über alle Aufarbeitungsschritte in 30% Ausbeute, bezogen auf geschützte Vorstufe (7) rein erhalten werden. Reines Buntesalz nativer Provenienz erbrachte beim Durchlaufen der gleichen Deblockierungs- und Aufarbeitungsbedingungen wie die geschützte synthetische Kette eine Wiederfindungsrate von 32% (Abb. 2). Daraus ergeben sich für (7) ein hoher Reinheitsgrad und weitgehende

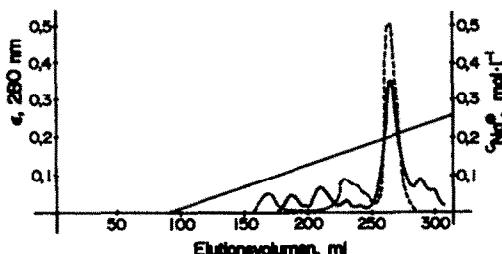


Abb. 2. —, Elutionsdiagramm des aus 50 mg geschützter synthetischer Rinderinsulin-B-Kette gewonnenen rohen Buntesalzes an CM-Cellulose. (Kapazität 0.69 mVal/g, Säule 2.6 × 36 cm, Elution mit 0.1 m Essigsäure bei linearem NaCl-Gradienten.) Reinausbeute 10.9 mg, entspr. 30% d.Th. bezogen auf geschützte B-Kette; —, Elutionsdiagramm der äquivalenten Menge (36 mg) von B-Ketten-Buntesalz nativer Herkunft, denselben Acidolyse-, Sulfitolyse- und Aufarbeitungsbedingungen ausgesetzt wie die geschützte synthetische B-Kette. Wiederfindungsrate: 11.5 mg, entspr. 32% d.Th.

Freiheit von anderweitigen peptidischen Beimengungen.

Wurde die Deblockierung der synthetischen B-Kette (7) wie beschrieben hydrogenolytisch mit anschliessendem Verseifungsschritt ausgeführt, resultierte bei gleichem Aufarbeitungsgang eine gegenüber der HBr/TFE-Acidolyse etwas verminderte Reinausbeute von 20% an Buntesalz.

Das so gewonnene S-Sulfonat ist chromatographisch und elektrophoretisch einheitlich und in allen physikalischen sowie analytischen Eigenschaften mit authentischem Rinderinsulin-B-Ketten-S-Sulfonat identisch (Abb. 3).

Wie der enzymatische Abbau zeigte, weist es weitgehende sterische Homogenität auf und besitzt die gleichen insulinbildenden Eigenschaften wie das B-Ketten-S-Sulfonat nativer Herkunft.



Abb. 3. Hochspannungspapierelektrophorese von synthetischem Rinderinsulin-B-Ketten-S-Sulfonat (a) und nativer Referenz (b), (Puffersystem Ameisensäure/Eisessig/4 m Harnstoff = 3:2:15; pH 1.9; 45 V cm<sup>-1</sup>; Spezialpapier FN 4).

#### EXPERIMENTELLER TEIL

##### Allgemeines

Die Messung der  $[\alpha]_{546}$ - und  $[\alpha]_{570}$ -Werte erfolgte mit einer Ablesegenaugigkeit von  $\pm 0.01^\circ$ . Die  $[\alpha]$ -Werte wurden hieraus mit einer Genauigkeit von  $\pm 0.5^\circ$  berechnet. Die Schmelzpunkte sind korrigiert. Zur Dünnschichtchromatographie wurde Kieselgel H "Merck" (Schichtdicke 0.25 mm, lufttrocken) verwendet. Die Papierchromatographie wurde mit Chromatographiepapier FN 4 des VEB Spezialpapierfabrik Niederschlag nach aufsteigender Methode durchgeführt. Bei der Hochspannungselektrophorese wurde im Puffersystem Ameisensäure/Eisessig/4 m Harnstoff = 3:2:15 (pH 1.9) bei einer Feldstärke von 45 V cm<sup>-1</sup> und unter Verwendung von Spezialpapier FN 4 gearbeitet. Die Laufzeit betrug pro Elektropherogramm 45 Min. Zur Dialyse wurde Nephrophan Dialysiermembran (VEB Filmfabrik Wolfen) verwendet.

Als Laufmittel kamen zur Anwendung:

System A: n-Butanol/Eisessig/Wasser = 4:1:1

B: Chloroform/Methanol = 9:1

- C: sek. Butanol/Ameisensäure/Wasser = 75:15:10  
 D: Chloroform/Methanol = 2:1  
 E: *n*-Propanol/Amoniak (25% ig) = 7:3  
 F: Chloroform/Methanol = 6:1  
 G: Aceton/Benzol = 5:8  
 H: Äthanol/ Wasser/ Benzol/ Eisessig = 8:4:2:1  
 I: *n*-Butanol/Eisessig/Wasser/Pyridin = 30:6:24:20  
 K: Chloroform/Methanol = 3:7  
 L: sek. Butanol/Eisessig/7 m Harnstoff = 12.5:0.9:11.5

Zur Sichtbarmachung der Peptidderivate wurden Ninhydrin-Cd-Reagens,<sup>15</sup> Chlor-Tolidin-Reagens,<sup>16</sup> Chromschwefelsäure<sup>17</sup> benutzt. Bei den Docosapeptidderivaten und der geschützten Form der Insulin-B-Kette wurden die Dünnschichtplatten vor dem Besprühen mit Ninhydrin-Cd-Reagens 4 h Totalhydrolysebedingungen (Stehenlassen über konz. HCl bei 90°C im geschlossenen Gefäß) ausgesetzt und anschließend gründlich belüftet. Bei der Papierchromatographie und der Hochspannungselektrophorese wurde PAULY-Reagens zur Sichtbarmachung der Peptide verwendet. Die Aminosäureanalysen sind korrigiert.

#### Boc-Hexadecapeptidester B 15-30 (5)

1.50 g (0.81 mmol) Boc-Decapeptidester B 21-30 (1) werden 4 h bei 20°C mit 50 ml 100 proz. Ameisensäure geschüttelt, bei 15 Torr zur Trockene eingedampft, der Rückstand in Methanol/Chloroform = 10:1 aufgenommen und erneut *i. Vak.* eingeengt.

Nach Lösen des verbliebenen Öls in 5 ml DMF werden zur Entfernung von Formiat-Ionen unter Röhren 100 ml 0.3 n NH<sub>4</sub>OH zugetropft, der ausgefallene Niederschlag abzentrifugiert und mit kaltem Wasser neutralgewaschen. Nach Trocknen bei 0.01 Torr wird der weiß anfallende, chromatographisch einheitliche, N<sup>α</sup>-deblockierte Decapeptidester (1a) noch mehrmals mit Äther gewaschen und erneut bei 35°C und 0.01 Torr 5 h über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet. Ausbeute: 1.42 g (91% d.Th.); Schmp.: 162–165°C;  $[\alpha]_D^{20} = -21.6^\circ$  (c = 1.0, DMF); C<sub>94</sub>H<sub>112</sub>N<sub>14</sub>O<sub>17</sub> × HCl × 10H<sub>2</sub>O (1926.48); Ber. C, 58.61; H, 6.91; N, 10.19. Gef. C, 58.77; H, 6.87; N, 10.12. R<sub>f</sub>: 0.59 (A); 0.15 (D); 0.65 (E). Aminosäureanalyse: (6 n HCl, 110°C, 24 h) Glu 1.0 (1), Arg 1.1 (1), Gly 1.0 (1), Phe 2.0 (2), Tyr 0.8 (1), Thr 0.9 (1), Pro 0.9 (1), Lys 1.0 (1), Ala 1.0 (1); Sakaguchi-Reaktion<sup>18</sup> positiv.

Zwecks Kupplung zum Boc-Hexadecapeptidester B 15-30 (5) werden 1.23 g (1.4 mmol) Boc-Hexapeptidsäure B 15-20 (2) in 6 ml DMF gelöst, mit 567 mg (4.2 mmol) HOBT versetzt, bei 0°C 288 mg (1.4 mmol) DCC hinzugefügt und die Lösung 4 h bei 0°C gehalten. Danach werden 1.34 g (0.70 mmol) N<sup>α</sup>-deblockierter Decapeptidester B 21-30 (1a) in 4 ml DMF zugetropft und die Reaktionslösung 24 h bei 0°C, 48 h bei Raumtemp. und 24 h bei 40°C geführt. Nach Abfiltrieren des Dicyclohexylharnstoffes und Nachwaschen mit 1 ml DMF wird das Filtrat bei 0.01 Torr auf die Hälfte eingeengt und mit 100 ml Äther/Petroläther = 5:1 gefällt. Man löst den abzentrifugierten Niederschlag dann in wenig DMF und fällt mit eiskaltem 0.3 n NH<sub>4</sub>OH-Lösung. Der ausgefallene Niederschlag wird abzentrifugiert, abermals intensiv mit kalter 0.3 n NH<sub>4</sub>OH-Lösung digeriert, abgetrennt, 3 × mit kaltem Wasser und 2 × mit 5% iger KHSO<sub>4</sub>-Lösung gewaschen. Anschließend wird der abzentrifugierte Niederschlag mit kaltem Wasser neutralgewaschen und zur weiteren Reinigung noch mehrmals mit wenig Chloroform/Methanol = 1:5 und Äther gewaschen. Der verbliebene Rückstand wird 5 h bei 0.01 Torr und 35°C über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet, wobei der chromatographisch reine Boc-Hexadecapeptidester B 15-30 (5) als amorphes weißes Pulver anfiel. Ausbeute: 1.24 g (67% d.Th.); Schmp.: 248–253°C (Zers.);  $[\alpha]_D^{20} = -38.5^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{20} = -34.5^\circ$  (c = 1.0, DMF/HMPT = 1:1); C<sub>136</sub>H<sub>218</sub>N<sub>26</sub>O<sub>32</sub>S<sub>2</sub> × HCl (2645.66); Ber. N, 10.59; Gef. N, 10.44. R<sub>f</sub>: 0.60 (E); 0.80 (F); 0.52 (G); Sakaguchi-Reaktion positiv; Ellman-Reaktion<sup>19</sup> negativ.

#### Boc-Docosapeptidester B 9-30 (6)

Zur N<sup>α</sup>-Deblockierung des Boc-Hexadecapeptidesters B 15-30 (5) wurden 1.06 g (0.40 mmol) in 2 ml DMF eingetragen und unter Zusatz von 0.59 ml (8 mmol) Äthylmercaptan 2 h bei 20°C in 30 ml 4 n HCl/Dioxan geschüttelt. Nach Einengen bei 15 Torr

wird mit DMF auf 5 ml aufgefüllt und mit 150 ml kalter 0.3 n NH<sub>4</sub>OH-Lösung versetzt, der Niederschlag abzentrifugiert, mit kaltem Wasser neutralgewaschen und über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet. Anschließend digeriert man mehrmals mit Äther und trocknet den chromatographisch rein erhaltenen, N<sup>α</sup>-deblockierten Hexadecapeptidester B 15-30 (5a) bei 0.01 Torr und 35°C 5 h über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Ausbeute: 790 mg (75% d.Th.); Schmp.: 244–248°C (Zers.);  $[\alpha]_D^{20} = -17.0^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{20} = -14.4^\circ$  (c = 0.1, DMF); C<sub>134</sub>H<sub>170</sub>N<sub>20</sub>O<sub>24</sub>S<sub>2</sub> × HCl × 5H<sub>2</sub>O (2635.54); Ber. C, 61.30; H, 6.88; N, 10.58; Gef. C, 61.40; H, 7.02; N, 10.40. R<sub>f</sub>: 0.65 (E); 0.15 (F); 0.68 (I). Aminosäureanalyse: (6 n HCl, 110°C, 24 h) Leu 2.0 (2); Tyr 2.0 (2); Val 1.0 (1); Cys 0.9 (1); Gly 2.0 (2); Glu 0.95 (1); Arg 1.0 (1); Phe 2.0 (2); Thr 0.9 (1); Pro 1.0 (1); Lys 0.95 (1); Ala 1.0 (1); Ellman-Reaktion negativ.

Zur quantitativen Bestimmung des Gehaltes an Cys-SEt-Gruppen werden 5 mg N<sup>α</sup>-deblockierter Hexadecapeptidester B 15-30 unter Stickstoffatmosphäre mit Zn in 25 ml 15% iger HCl reduziert, das freigesetzte Äthylmercaptan quantitativ in wässrigem phosphatgepuffertem Methanol bei pH 8 aufgefangen und die Konzentration nach Anfärben mit Ellman's Reagens spektralphotometrisch bei 412 nm gegen Eichkurve bestimmt. Gehalt an SEt-Gruppen: 0.98 Äquivalente (Fehlergrenze  $\pm 5\%$ ).

Für die Kupplung zum Boc-Docosapeptidester 139-30 (6) werden 883 mg (0.75 mmol) Boc-Hexapeptidsäure B 9-14 (3) mit 304 mg (2.25 mmol) HOBT und 155 mg (0.75 mmol) DCC in 3 ml DMSO bei 0°C 4 h voraktiviert. Anschließend werden 639 mg (0.25 mmol) N<sup>α</sup>-deblockierter Hexadecapeptidester B 15-30 (5a) in 2 ml DMSO zugefügt und 24 h bei 0°C, 48 h bei 20°C sowie 48 h bei 40°C geführt.

Nach Abfiltrieren des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffes und Nachwaschen mit 1 ml DMSO wird das Filtrat langsam mit 0.3 n NH<sub>4</sub>OH-Lösung versetzt und der Niederschlag abzentrifugiert. Nach erneutem Behandeln mit 0.3 n NH<sub>4</sub>OH-Lösung und Abzentrifugieren wird der Niederschlag mit kaltem Wasser und 3 × mit 5% iger KHSO<sub>4</sub>-Lösung behandelt, abermals mit kaltem Wasser neutralgewaschen und anschließend mehrmals mit Methanol und Äther gewaschen. Der Boc-Docosapeptidester B 9-30 (6) wird nach 8-stündigem Trocknen bei 30°C und 0.01 Torr über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> als amorphes weißes Pulver in chromatographisch reiner Form erhalten. Ausbeute: 565 mg (61% d.Th.); Schmp.: > 280°C (Zers.);  $[\alpha]_D^{20} = -23.7^\circ$  (c = 1.0, DMSO); C<sub>260</sub>H<sub>246</sub>N<sub>26</sub>O<sub>35</sub>S<sub>2</sub> × HCl (3704.93); Ber. N, 10.55; Gef. N, 10.28. R<sub>f</sub>: 0.65 (A); 0.90 (H); 0.69 (I); Aminosäureanalyse: (6 n HCl, 110°C, 24 h) Ser 0.9 (1); His 0.9 (1); Leu 3.0 (3); Val 2.2 (2); Glu 2.0 (2); Ala 2.0 (2); Tyr 1.8 (2); Cys 0.9 (1); Gly 2.0 (2); Arg 0.9 (1); Phe 1.9 (2); Thr 0.8 (1); Pro 0.9 (1); Lys 1.0 (1); Ellman-Reaktion negativ; Pauly-Reaktion negativ.<sup>20</sup>

#### Geschützte Insulin-B-Kette Z-1-30-OBzI (7)

500 mg (0.135 mmol) Boc-Docosapeptidester B 9-30 (6) werden in 2 ml DMSO gelöst und mit 25 ml 4 n HCl/Dioxan unter Zugabe von 0.20 ml (2.7 mmol) Äthylmercaptan 3 h bei 20°C deblockiert. Nach Abziehen des Dioxans *i. Vak.* wird die DMSO-Lösung unter Röhren mit 0.3 n NH<sub>4</sub>OH-Lösung versetzt, der Niederschlag abgetrennt und mit kaltem Wasser gründlich neutral gewaschen. Man digeriert den Rückstand noch mehrmals in Methanol und Äther, zentrifugiert ab und erhält nach 8-stündigem Trocknen bei 35°C über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> den chromatographisch einheitlichen deblockierten Docosapeptidester B 9-30 (6a). Ausbeute: 434 mg (85% d.Th.); Schmp.: > 250°C (Zers.);  $[\alpha]_D^{20} = -36.9^\circ$  (c = 0.1, DMSO); C<sub>195</sub>H<sub>240</sub>N<sub>24</sub>O<sub>33</sub>S<sub>2</sub> × HCl × 10H<sub>2</sub>O (3784.83); Ber. C, 61.80; H, 6.97; N, 10.32; Gef. C, 61.72; H, 7.05; N, 10.20. R<sub>f</sub>: 0.60 (E); 0.88 (H); 0.70 (I); Ellman-Reaktion negativ; Pauly-Reaktion negativ; Gehalt an SEt-Gruppen: 0.95 Äquivalente.

Für die Kupplung zum B-Kettenderivat (7) werden 406 mg (0.30 mmol) Z-Oktapeptidsäure B 1-8 (4) mit 121 mg HOBT (0.90 mmol) und 62 mg (0.30 mmol) DCC in 1.5 ml DMSO bei 0°C 4 h voraktiviert. Nach Zugabe von 378 mg (0.10 mmol) N<sup>α</sup>-deblockiertem Docosapeptidester B 9-30 (6a) in 1.5 ml DMSO wird 24 h bei 0°C, 48 h bei Raumtemp. und 48 h bei 40°C geführt, der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und mit 1 ml DMSO ausgewaschen. In das erhaltene Filtrat werden 100 ml 0.3 n NH<sub>4</sub>OH-Lösung eingerührt, der ausgefallene Niederschlag abzentrifugiert und mit 0.3 n NH<sub>4</sub>OH-Lösung digeriert, mit

Wasser, 5%iger  $\text{KHSO}_4$ -Lösung gewaschen und mit kaltem Wasser neutralgewaschen, sowie mehrmals mit Methanol und Äther behandelt. Nach Trocknen über  $\text{P}_2\text{O}_5$ , bei 0.01 Torr und 35°C fällt das B-Kettenderivat (7) als weisses amorphes Pulver chromatographisch rein an. Ausbeute: 287 mg (57% d.Th.); Schmp.: > 235°C (Zers.);  $[\alpha]_D^{20} = -17.5^\circ$  ( $c = 0.4$ , DMSO);  $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}_2 \times \text{HCl} \times \text{H}_2\text{O}$  (5030.43); Ber. C. 63.03; H. 6.67; N. 11.14; Gef. C. 62.77; H. 6.74; N. 11.29.  $R_f$ : 0.60 (A); 0.63 (E); 0.68 (I).

Nach partieller Deblockierung in  $\text{N}^{\text{m}}$ -Position (3 ml 100%ige  $\text{HCOOH}$ , 1 mg B-Kette, 2 h, 40°C) ergibt sich für das chromatographisch einheitliche B-Kettenderivat der  $R_f$ -Wert: 0.68 (K). Bei entsprechender  $\text{HCOOH}$ -Behandlung zeigen H-Docosapeptid B 9-30 (6a)  $R_f$ : 0.75 (K) und Z-Oktapeptidsäure B 1-8 (4)  $R_f$ : 0.52 (K). Aminosäureanalyse: (6 n HCl, 110°C, 72 h) Phe 3.2 (3); Val 3.0 (3); Asp 1.0 (1); Glu 3.0 (3); His 2.0 (2); Leu 4.2 (4); Cys 1.9 (2); Gly 2.9 (3); Ser 0.8 (1); Ala 1.9 (2); Tyr 2.3 (2); Arg 0.8 (1); Thr 0.9 (1); Pro 1.0 (1); Lys 0.9 (1). Ellman-Reaktion negativ; Pauly-Reaktion negativ; Gehalt an S-Et-Gruppen: 1.90 Äquivalente.

#### Deblockierung der geschützten Insulin-B-Kette (7)

(a)  $\text{HBr}/\text{TFE}$ -Acidolyse. 100 mg (0.02 mmol) geschütztes B-Kettenderivat B 1-30 (7) wurden in 42.5 ml TFE gelöst, 2.5 ml Athylmercaptan und 5 ml Anisol zugesetzt und durch diese Reaktionslösung 1.5 h bei Raumtemp. ein trockener, bromfreier HBr-Strom geleitet. Anschliessend engte man das Gemisch bei 10 Torr und 20°C ein, wusch den Rückstand je 3x mit abs. Äther und trockenem Essigester und trocknete ihn bei 0.01 Torr über  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Zur Überführung in das Buntosalz wurde das verbliebene Pulver in 10 ml 8 m Harnstofflösung, die mit Tris/HCl-Puffer auf pH 8.6 eingestellt ist, eingetragen und nach Zugabe von 250 mg  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  und 250 mg  $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$  12 h bei Raumtemp. gerhrt. Die sich anschliessende 6-stündige Dialyse gegen destilliertes Wasser bei halbstündigem Wasserwechsel wurde nach 3 h unterbrochen, die zu dialysierende Lösung mit 0.2 n NaOH auf pH 10 eingestellt, danach mit Eisessig bis pH 5 angesäuert und die Dialyse weitergeführt. Anschliessend engte man ein und lyophilisierte den Rückstand. Es konnten 65 mg (90% d.Th.) eines Rohproduktes erhalten werden, dessen Hauptbande gleiche elektrophoretische Beweglichkeit und identisches papier- und dünnenschichtchromatographisches Verhalten zeigte, wie die S-Sulfonatform der nativen Insulin-B-Kette. Aminosäureanalyse: Phe 3.0 (3); Val 3.1 (3); Asp 0.9 (1); Glu 2.7 (3); His 1.9 (2); Leu 4.1 (4); Cys 2.2 (2); Gly 3.0 (3); Ser 0.9 (1); Ala 2.0 (2); Tyr 2.1 (2); Arg 1.0 (1); Thr 0.9 (1); Pro 0.9 (1); Lys 0.9 (1).

(b)  $\text{H}_2/\text{Pd}/\text{BF}_3$ -Äther-Hydrierung mit anschliessender Verseifung. 100 mg (0.02 mmol) geschütztes B-Kettenderivat B 1-30 (7) wurden in 10 ml wasserfreiem DMF gelöst, mit 50 mg (0.5 mmol) frisch hergestelltem Pd-Katalysator und 28.2 mg (0.2 mmol) destilliertem  $\text{BF}_3$ -Ätherat versetzt. Die Reaktionslösung wurde nun 1 h mit  $\text{O}_2$ -freiem, trockenem Wasserstoff gespült und anschliessend unter  $\text{H}_2$ -Atmosphäre bei 60°C geschüttelt. Nach jeweils 2 Tagen wurden erneut je 50 mg frisch bereiteter Pd-Katalysator zugesetzt und mit Wasserstoff gespült. Nach 10 Tagen wurde der Hydrierungsansatz vom Pd-Katalysator abfiltriert, der Katalysator mehrmals mit heissem DMF ausgewaschen und das Filtrat eingeengt. Das verbliebene Öl wurde je 3x mit je 10 ml abs. Äther und je 10 ml trockenem Essigester gewaschen, in 10 ml 8 m Harnstofflösung, die mit Tris/HCl-Puffer auf pH 8 eingestellt ist, gelöst, 250 mg  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  und 250 mg  $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$  zugesetzt und 12 h bei Raumtemp. gerhrt. Anschliessend erfolgte 6 h Dialyse bei halbstündigem Wasserwechsel gegen destilliertes Wasser. Das Dialysat engte man bis auf 5 ml ein, versetzte zwecks Spaltung restlicher Estergruppen mit 5 ml 0.4 n NaOH-Lösung und liess 1 h bei Raumtemp. stehen. Anschliessend wurde mit wässriger 1 n HCl-Lösung auf pH 7 eingestellt, das Volumen der Lösung auf 3 ml eingeengt und erneut wie oben dialysiert. Nach Einengen wurde der Rückstand abermals der oxidativen Sulfatolyse zugeführt. Nach Dialyse, Einengen und Lyophilisation verblieben 61 mg (85% d.Th.) Rohprodukt, dessen Hauptbande elektrophoretisch, dünnenschicht- und papierchromatographisch identisch mit dem S-Sulfonat der nativen Insulin-B-Kette war. Aminosäureanalyse: Phe 3.1 (3);

Val 3.0 (3); Asp 0.9 (1); Glu 2.9 (3); His 1.8 (2); Leu 4.1 (4); Cys 2.2 (2); Gly 3.0 (3); Ser 0.8 (1); Ala 2.1 (2); Tyr 1.8 (2); Arg 1.0 (1); Thr 0.9 (1); Pro 0.9 (1); Lys 0.9 (1).

**Reinigung.** Zur Entfernung restlicher Salze wurden 32.5 mg des aus  $\text{HBr}/\text{TFA}$ -Acidolyse gewonnenen Rohproduktes (entspr. 50 mg zur Abspaltung eingesetztem geschützten B-Kettenderivat B 1-30 (7) in 0.05 m  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung über Sephadex G 15 (Säule 2 × 60 cm) chromatographiert. Danach erfolgte die Reinigung an CM-Cellulose (Kapazität 0.69 m Val/g, Säule 2.6 × 36 cm) unter Elution mit 0.1 m Essigsäure, welche 7 molar an Harnstoff war, bei linearem  $\text{NaCl}$ -Gradienten. Nach erneuter Dialyse gegen eiskaltes Wasser, Feinentsalzung und Nachreinigung über Sephadex G 50 (Säule 2 × 60 cm, Elutionsmittel 1 m Essigsäure), Einengen und Lyophilisation wurden 10.9 mg (30% d.Th.) elektrophoretisch und chromatographisch einheitliches Rinderinsulin-B-Ketten-S-Sulfonat erhalten, das in allen physikalischen und analytischen Daten sowie seinen insulinbildenden Eigenschaften mit natürlichem Rinderinsulin-B-Ketten-S-Sulfonat identisch ist. Aus der äquivalenten Menge (36 mg) nativem Insulin-B-Ketten-S-Sulfonat erhielt man unter völlig identischen Deblockierungs- und Aufarbeitungsbedingungen 11.5 mg (32% d.Th.) unverändertes Ausgangsprodukt rein zurück.

Aus 30.5 mg Rohprodukt der Hydrierung (entspr. 50 mg des zur Hydrogenolyse eingesetzten geschützten B-Kettenderivates B 1-30 (7)) konnten nach analogem Reinigungsverfahren 6.8 mg (20% d.Th.) chromatographisch und elektrophoretisch einheitliche Reinsubstanz gewonnen werden, deren analytische und physikalische Daten identisch mit denen des durch  $\text{HBr}/\text{TFA}$ -Acidolyse gewonnenen Produktes sowie mit nativem Rinderinsulin-B-Ketten-S-Sulfonat waren.

Aus der zu 50 mg geschützter B-Kette äquivalenten Menge (36 mg) nativem Insulin-B-Ketten-S-Sulfonat, den gleichen Hydrierungs- und Aufarbeitungsbedingungen unterworfen, konnten 7.5 mg (21% d.Th.) in reiner Form wiedergefunden werden. Dünnschichtchromatographie:  $R_f$ : 0.26 (E); Papierchromatographie:  $R_f$ : 0.70 (L).

Das Syntheseprodukt erwies sich bei Papierhochspannungselektrophorese also einheitlich und zeigte gleiche elektrophoretische Beweglichkeit wie natives Rinderinsulin-B-Ketten-S-Sulfonat (s. Abb. 3).

#### Aminosäurezusammensetzung des synthetischen Insulin-B-Ketten-S-Sulfonates

Amino-säure	Theore-tisch	6 nHCl-Hydrolyse	Abbau mit Aminopeptidase M <sup>21</sup>
Phe	3	3.0	3.0
Val	3	3.0	3.0
Asp	1	1.0	0.9
Glu	3	3.1	2.9
His	2	1.9	
Leu	4	3.8	3.9
Cys (S-Sulfo-cystein)	2	1.7	1.9
Gly	3	3.0	2.9
Ser	1	0.9	1.0
Ala	2	2.0	1.9
Tyr	2	1.8	1.7
Arg	1	1.0	0.8
Thr	1	1.0	†
Pro	1	0.9	†
Lys	1	1.0	0.9

<sup>†</sup>Nicht bestimmt.

#### LITERATUR

- Zusammenfassung früherer Arbeiten: K. Lübke und H. Klostermeyer, *Adv. Enzymol.* 33, 445 (1970).
- G. P. Schwartz und P. G. Katsoyannis, *J. Chem. Soc., Perkin Trans I* 2894 (1973).
- M. J. Titov, Z. A. Adremasova, Zh. D. Bespalova und L. I. Leontjeva, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 209, 227 (1973).

- <sup>4</sup>H. Zahn und G. Schmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **731**, 101 (1970).  
<sup>5</sup>H. Rink und B. Riniker, *Helv. Chim. Acta* **57**, 831 (1974).  
<sup>6</sup>G. Losse, M. Mauck und H. Stange, *Tetrahedron* **33**, 1813 (1977).  
<sup>7</sup>G. Losse und K. J. Schumacher, *Ibid.* **33**, 1519 (1977).  
<sup>8</sup>G. Losse, K. J. Schumacher und H. Stange, *Ibid.* **33**, 1817 (1977).  
<sup>9</sup>G. Losse, B. Meisegeier, M. Mauck und H. Klenzel, *Ibid.* **33**, 1993 (1977).  
<sup>10</sup>G. Losse, B. Meisegeier, B. Schwenzer, H. Stange und K. J. Schumacher, *Z. Chem.* **17**, 203 (1977).  
<sup>11</sup>U. T. Ruegg und H. G. Gattner, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **356**, 1527 (1975).  
<sup>12</sup>E. Wünsch, *Methoden der organischen Chemie* (Houben-Weyl) Band XV/1, S. 53. Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart (1974).  
<sup>13</sup>H. Yajima, K. Kawasaki, Y. Kinomura, T. Oshima, S. Kimoto und M. Okamoto, *Chem. Pharmac. Bull. (Tokyo)* **16**, 1342 (1968); M. Okamoto, S. Kimoto, T. Oshima, Y. Kinomura, K. Kawasaki und H. Yajima, *Ibid.* **15**, 1618 (1967).  
<sup>14</sup>G. Losse und W. Naumann, *J. Prakt. Chem.* (im Druck).  
<sup>15</sup>J. Heilmann, J. Barrolier und E. Watzke, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **309**, 219 (1957).  
<sup>16</sup>J. Barrolier, *Naturwissenschaften* **48**, 404 (1961).  
<sup>17</sup>E. Ehrhardt und F. Cramer, *J. Chromatogr.* **7**, 405 (1962).  
<sup>18</sup>J. B. Jepson und J. Smith, *Nature* **172**, 100 (1953); J. Kalousek, J. M. Kutacek und J. Bilek, *Ceskoslov. Farm.* **4**, 188 (1955).  
<sup>19</sup>G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70 (1959).  
<sup>20</sup>E. v. Arx und R. Neher, *J. Chromatogr.* **12**, 329 (1963).  
<sup>21</sup>G. Pfeiderer, P. G. Celliers, M. Stanulovic, E. D. Wachsmuth, H. Determann und G. Braunitzer, *Biochem. Z.* **340**, 552 (1964).