

Der Methylsulfonyläthyloxycarbonyl-Rest als reversible Aminoschutzgruppe für Insulin

Rolf Geiger* und Rainer Obermeier

Hoechst Aktiengesellschaft,
D-6230 Frankfurt/M. 80, Postfach 800320, und

Godefridus I. Tesser

Abteilung für Organische Chemie der Katholischen Universität Toernooiveld,
Nijmegen, Niederlande

Eingegangen am 14. Februar 1975

Der Methylsulfonyläthyloxycarbonyl(Msc-)Rest¹⁾ läßt sich spezifisch in die Aminogruppen von A1-Glycin und B29-Lysin des Insulins einführen. Er erhöht die Löslichkeit des Insulins in polaren Lösungsmitteln. Diese Eigenschaft erleichtert die Reinigung von Msc₂-Insulin durch Verteilungschromatographie. Die Abspaltung der Schutzgruppen gelingt durch kurzes Einwirken von verd. Natronlauge bei 0°C ohne bedeutende Schädigung des Moleküls. Nach chromatographischer Reinigung ist die Kristallisationsneigung des zurückgebildeten Insulins gegenüber nativem Material nicht verändert. Die biologische Wirkung bleibt voll erhalten.

The Methylsulfonylethyloxycarbonyl Residue as a Reversible Amino Protecting Group for Insulin

The methylsulfonylethyloxycarbonyl(Msc) residue is introduced specifically into the amino groups of A1 glycine and B29 lysine of insulin. It increases the solubility of insulin in polar solvents. This property facilitates the purification of Msc₂-insulin by partition chromatography. Deprotection is accomplished by short treatment with dilute NaOH at 0°C, without noticeable damage of the molecule. Compared with native material, the tendency of the deprotected insulin to crystallize, following chromatographic purification, had not changed. The recovered insulin exhibits full biological activity.

Die unterschiedliche Reaktivität der 3 Aminogruppen des Insulins kommt darin zum Ausdruck, daß Isothiocyanate bevorzugt an der Aminogruppe des B1-Phenylalanins angreifen^{2,3)}, während unter geeigneten Bedingungen Reagentien wie *tert*-Butyloxy-carbonyl-azid überwiegend mit den Aminogruppen von A1-Glycin und B29-Lysin reagieren⁴⁾. Als Folge dieses Verhaltens entstand ein Bedürfnis nach säurestabilen Schutzgruppen, welche im Gegensatz zur Boc-Gruppe beim sukzessiven Abbau der B-Kette nach *Edman*⁵⁾ stabil bleiben.

¹⁾ *Abkürzungen:* Msc = Methylsulfonyläthyloxycarbonyl-, Ptc = Phenylthiocarbamoyl-, Tfa = Trifluoracetyl-, Boc = *tert*-Butyloxy-carbonyl-, -ONSu = *N*-Hydroxysuccinimidester.

²⁾ W. W. Bromer, S. Knapp Sheehan, A. W. Berns und E. R. Arquilla, *Biochemistry* **6**, 2378 (1967).

³⁾ B. Africa und F. H. Carpenter, *Biochemistry* **9**, 1962 (1970).

⁴⁾ R. Geiger, H. H. Schöne und W. Pfaff, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **352**, 1487 (1971).

⁵⁾ R. Geiger und D. Langner, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **354**, 1285 (1973).

Erste Versuche, den Trifluoracetylrest zu diesem Zweck zu verwenden, haben bereits *Borrás* und *Offord*⁶⁾ unternommen, indem sie das nach *Brandenburg*⁷⁾ hergestellte $N^{\alpha B1}$ -Phenylthiocarbamoyl-insulin ($N^{\alpha B1}$ -Ptc-Insulin) in das $N^{\alpha B1}$ -Ptc- $N^{\alpha A1}, N^{\epsilon B29}$ -Bis-Tfa-insulin überführten. *Edman*-Abbau ergab Des-Phe^{B1}- $N^{\alpha A1}, N^{\epsilon B29}$ -Bis-Tfa-insulin, das einen weiteren Abbau der B-Kette erlaubt hätte. Die Abspaltung des Tfa-Restes ist jedoch wegen der Alkaliempfindlichkeit des Insulins problematisch und erfordert in jedem Fall eine sorgfältige Reinigung des Endproduktes, ehe das freigesetzte Insulin kristallisierbar wird.

Die Beobachtung, daß Insulin in phenolhaltiger Lösung selbst gegen denaturierende Reagentien wie Hydrazin stabil ist, führte zur Verwendung des lange bekannten Phthaloylrestes, der mit ähnlicher Selektivität wie die Boc-Reste in A1 und B29 eingeführt werden kann⁸⁾. Damit war eine Möglichkeit gegeben, ohne weitere Reinigung der Zwischenprodukte über mehrmaligen *Edman*-Abbau zu Verbindungen wie dem bereits bekannten Des-(Phe-Val-Asn)^{B1-3}-[Glu⁴]insulin⁵⁾ zu gelangen. Nach Reinigung durch Verteilungschromatographie wies es dieselben Eigenschaften auf wie das Produkt, das über $N^{\alpha A1}, N^{\epsilon B29}$ -Bis-Boc-insulin durch dreimaligen *Edman*-Abbau erhalten worden war, wobei nach dem letzteren Verfahren nach jedem Abbauschritt die Boc-Gruppen erneut eingeführt werden mußten.

Eine neue Möglichkeit, Aminogruppen des Insulins durch säurestabile Schutzgruppen vorübergehend zu blockieren, eröffnete die kürzlich vorgeschlagene Methylsulfonyl-äthylloxycarbonyl(Msc-)Schutzgruppe^{9, 10)}. Der Msc-Rest gehört einem Verbindungstyp an, der schon früher als Schutzgruppe empfohlen wurde, denn Aryl- oder Alkylsulfonyl-äthylgruppen lassen sich unter Einwirkung von Alkali leicht durch β -Eliminierung entfernen¹¹⁻¹⁴⁾.

Die Msc-Gruppe besitzt gegenüber dem bereits beschriebenen Toluolsulfonyl-äthylloxycarbonylrest¹¹⁾ den Vorzug, daß sie die Löslichkeit von Peptiden in polaren Lösungsmitteln beträchtlich erhöht. Diese Eigenschaft kommt der Verwendung als Insulinschutzgruppe entgegen, denn die Reinigung der Derivate durch Verteilungschromatographie an Sephadex® LH 20 im System n-Butanol/Essigsäure/Wasser (8:4:40)⁵⁾ oder durch Gelchromatographie an Sephadex® G 50 oder G 75 setzt eine ausreichende Löslichkeit in den verwendeten Lösungsmitteln voraus.

Zunächst wurde geprüft, ob der Msc-Rest mit ähnlicher Selektivität in zwei der drei Aminogruppen des Insulins eintritt wie die Boc-Gruppe⁴⁾.

Die Reaktion von Insulin mit Msc-Hydroxysuccinimidester (Msc-ONSu)^{9, 10)} unter Bedingungen, wie sie für die Einführung der Boc-Gruppe angewandt wurden, nämlich in Dimethylformamid/1 N NaHCO₃, ergab ein Produkt, in dem Msc₂-Insulin vorherrschte,

⁶⁾ F. Borrás und R. E. Offord, *Nature* (London) **227**, 716 (1970).

⁷⁾ D. Brandenburg, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **350**, 741 (1969).

⁸⁾ R. Geiger und D. Langner, *Peptides 1974* (Proc. of the 13th European Peptide Symposium) Ed.: Y. Wolman, J. Wiley & Sons, New York und Israel Univ. Press (1975), S. 159.

⁹⁾ G. I. Tesser, in l. c.⁸⁾, S. 53.

¹⁰⁾ G. I. Tesser und J. C. Balvert-Geers, *Int. J. Peptide Protein Res.* **8** (1975), im Druck.

¹¹⁾ A. T. Kader und C. J. M. Stirling, *J. Chem. Soc.* **1964**, 258.

¹²⁾ M. Joaquina, S. A. Amaral, G. C. Barrett, H. N. Rydon und J. E. Willett, *J. Chem. Soc. C* **1966**, 807.

¹³⁾ P. M. Hardy, H. N. Rydon und R. C. Thompson, *J. C. S. Perkin I* **1972**, 5.

¹⁴⁾ A. W. Miller und C. J. M. Stirling, *J. Chem. Soc. C* **1968**, 2612.

wenn 2 Moläquivv. Msc-ONSu zugegeben wurden. Bei größerem Überschuß an Msc-ONSu entstand vorwiegend Msc₃-Insulin.

Vor die Reinigung des Rohprodukts durch Verteilungschromatographie wurde zunächst eine Gelchromatographie an Sephadex G 10 mit 0.5proz. wäbr. Ammoniumcarbonat geschaltet. Die Lösung mußte mit verd. Essigsäure auf pH 8–8.5 gestellt werden, da sonst bereits die Msc-Gruppen teilweise abgespalten wurden. Bei dieser Vorreinigung wurde neben Salzen eine Verbindung mit starker UV-Absorption bei 254 nm abgetrennt.

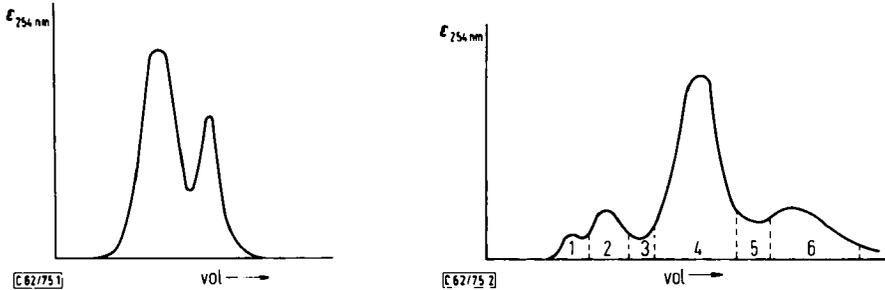


Abb. 1. Vorreinigung von Msc₂-Insulin an Sephadex® G 10 in 0.5proz. wäbr. Ammoniumcarbonat bei pH 8–8.5

Abb. 2. Reinigung von Msc₂-Insulin durch Verteilungschromatographie an Sephadex® LH 20 im System n-Butanol/Essigsäure/Wasser (8 : 4 : 40). Frakt. 2 enthält Msc-Insulin, Frakt. 4 Msc₂-Insulin und Frakt. 6 Msc₃-Insulin (vgl. experimenteller Teil)

Bei der nachfolgenden Verteilungschromatographie an Sephadex LH 20 im System n-Butanol/Essigsäure/Wasser (8 : 4 : 40) gelang die Trennung in Msc-, Msc₂- und Msc₃-Insulin glatt. Nur Insulin erschien nicht als vollständig abgetrennter Peak, sondern als Schulter vor Msc-Insulin. Abb. 1 zeigt den Verlauf der Extinktionskurve bei der Vorreinigung an Sephadex G 10, Abb. 2 den bei der Verteilungschromatographie.

Die zu den Fraktionen gehörenden Papierelektrophoresen bei pH 2 zeigt Abb. 3. Bande A entspricht dem Rohprodukt mit etwa 80% Msc₂-Insulin, 15–20% Msc₃-Insulin, 5% Msc-Insulin und einer geringen Menge Insulin. Die gute Auftrennung dieses Gemisches verdeutlicht die hohe Trennleistung der Verteilungschromatographie.

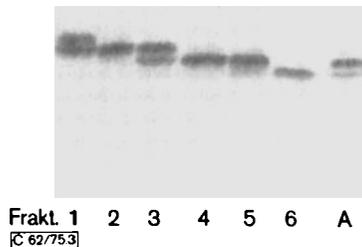


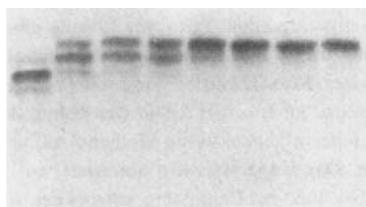
Abb. 3. Papierelektrophorese bei pH 2. Fraktionen aus der Verteilungschromatographie nach Abb. 2

Daß in Abb. 3 in Fraktion 4 noch eine geringe Menge der niedrigen Acylierungsstufe sichtbar ist, rührt daher, daß im vorliegenden Versuch diese Fraktion noch nicht eng genug geschnitten wurde. Bei einer Nachreinigung wurden die Verbindungen glatt getrennt. Schwierigkeiten hinsichtlich der Löslichkeit bestanden nicht, auch beim Auftragen auf die Säule konnte eine vorteilhafte hohe Konzentration erreicht werden.

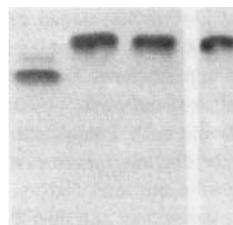
Bei der Reinigung durch Verteilungschromatographie in saurem Medium ist die Schutzgruppe damit anderen Resten überlegen. So können zum Beispiel Boc-Insuline bis zur Stufe des Boc₂-Insulins zwar glatt voneinander getrennt werden, jedoch erscheint Boc₃-Insulin erst spät und nicht als wohlausgebildeter Peak, sondern als flache, langgestreckte Erhebung.

Über die Lage der Msc-Gruppen im Msc₂-Insulin gab der *Edman*-Abbau¹⁵⁾ Auskunft. Alleiniges Abspaltungsprodukt war das Phenylthiohydantoin des Phenylalanins, das durch dünn-schichtchromatographischen Vergleich mit einer authentischen Probe identifiziert wurde. Das Phenylthiohydantoin des Glycins lag, wenn überhaupt, nur in einer Menge von < 3% vor, d. h., N^αB¹, N^εB²⁹-Bis-Msc-insulin konnte nur in äußerst geringem Umfang entstanden sein. N^αA¹, N^εB¹-Bis-Msc-insulin andererseits würde beim *Edman*-Abbau ein Msc₂-N^εB²⁹-Ptc-Insulin und nach Alkalibehandlung ein Monoacyl-insulin ergeben, das sich bei der Elektrophorese zu erkennen gäbe. Eine solche Verbindung kann nicht ausgeschlossen werden, wie ein leichter Schatten in Höhe von Monoacyl-insulin nach Abspaltung der Msc-Gruppen in den Abb. 4 und 5 erkennen läßt. Sie erreicht aber die Nachweisgrenze von etwa 3% nur knapp und würde bei der nachfolgenden Reinigung abgetrennt werden.

Die Abspaltung der Msc-Gruppen verlief ohne ernste Komplikationen. Schon bei pH 10–11 tritt β-Eliminierung ein, jedoch verläuft die Reaktion bei pH 13 viel rascher und günstiger.



A 0.5 1 2 5 10 20 I
 C 62/754 Abspaltungszeit (min)



A 0.5 1 I
 C 62/755 Abspaltungszeit (min)

Abb. 4. Abspaltung der Msc-Gruppen bei pH \approx 10.5. A = Ausgangsprodukt (vorgereinigtes Msc₂-Insulin, das noch Msc- und Msc₃-Insulin enthält. I = Insulin)

Abb. 5. Abspaltung der Msc-Gruppen bei pH \approx 13. A = Ausgangsprodukt (vorgereinigtes Msc₂-Insulin, das noch Msc- und sehr wenig Msc₃-Insulin enthält. I = Insulin)

Wie sich aus dem Vergleich der Abb. 4 und 5 ergibt, bleibt bei längerdauernder Alkalibehandlung in der Papierelektrophorese (pH 2) ein Schatten unterhalb des Insulins sichtbar, der bei kurzer Behandlung mit höherer Alkalikonzentration geringer ist.

Die Abspaltungsversuche wurden zunächst mit vorgereinigtem Msc₂-Insulin unternommen; die reine Verbindung verhielt sich analog. Eine geringere Kristallisationsnei-

¹⁵⁾ P. Edman, Acta Chem. Scand. 4, 277, 283 (1950); 7, 700 (1953).

gung des Insulins nach Abspaltung der Msc-Gruppen beobachtet man auch beim Insulin selbst, wenn es in entsprechender Weise mit Alkali behandelt wurde. So muß angenommen werden, daß sie sich als Folge dieser Behandlung einstellt und nicht ursächlich mit Eigenschaften der Msc-Gruppe verknüpft ist.

Nach chromatographischer Reinigung an Sephadex G 50 superfine unterscheidet sich das Kristallisationsverhalten nicht mehr von dem des nativen Insulins. Auch die Kristallform ist dieselbe. Die biologische Wirkung wird durch die Einführung und Abspaltung der Msc-Gruppen nicht beeinträchtigt.

Der Msc-Rest dürfte sich somit als *N*-Schutzgruppe für Insulin eignen und vor allem bei Semisynthesen vorteilhaft sein.

Wir danken Herrn Dr. K. Geisen für biologische Bestimmungen, den Herren D. Langner und J. Ludwig für experimentelle Unterstützung, Herrn H. Langenberger für Kristallisationsversuche.

Experimenteller Teil

Die Papierelektrophorese von Insulin und dessen Derivaten wurde in Essigsäure/Ameisensäure/Wasser (5:1:20) bei $\text{pH} \approx 2$ nach l. c.⁴⁾ ausgeführt. Anfärben mit Bromphenolblau nach Cremer und Tiselius¹⁶⁾. Auftrennung der Phenylthiohydantoine durch Dünnschichtchromatographie auf DC-Fertigplatten „Merck“ Kieselgel 60 F 254 im Laufmittel Essigester/Cyclohexan (7:3), Nachweis durch Fluoreszenzlöschung.

Zur säulenchromatographischen Trennung der Msc-Insuline wurde das Dextran-Gel Sephadex® LH 20, zur Reinigung des Insulins Sephadex® G 50 superfine der Firma Pharmacia, Uppsala, verwendet. Zur Messung der UV-Extinktion im Eluat diente das UV-Kolorimeter Uvicord I in Verbindung mit dem Fraktionssammler UltraRac® der Firma LKB, Stockholm.

1. $N^{\alpha A1}, N^{\epsilon B29}$ -Bis(methylsulfonyläthyloxycarbonyl)insulin (Rind) (*Msc*₂-Insulin)

5.0 g (0.85 mmol) krist. Rinderinsulin Hoechst werden in einer Mischung aus 10 ml 1 N NaHCO₃ und 20 ml Dimethylformamid gerührt. Ein Teil des NaHCO₃ fällt aus; Insulin geht fast völlig in Lösung. Dann verdünnt man mit 40 ml Dimethylformamid. Zu dieser Lösung gibt man mit jeweils 45 min Abstand 200, 112, 100 und 50 mg (insgesamt 462 mg, d. s. 1.75 mmol) Methylsulfonyläthyloxycarbonyl-*N*-hydroxysuccinimidester (*Msc*-ONSu)^{9, 10)} und rührt nach der letzten Zugabe 45 min nach. Dann stellt man mit Essigsäure auf etwa pH 5, fällt das Rohprodukt durch Ätherzugabe ölig aus, nimmt es nach Dekantieren des Äthers in wenig Methanol auf und versetzt die Suspension mit dem 5fachen Vol. Essigester. Das Ungelöste wird abfiltriert, mit Essigester und Äther gewaschen und über P₄O₁₀ und KOH i. Vak. bei Raumtemp. getrocknet. Ausb. 5.9 g.

1.0 g dieses Rohproduktes werden in 15 ml 0.5proz. wäßriger Ammoniumcarbonatlösung, die mit Essigsäure auf pH 8 gestellt wurde, gelöst. Man filtriert langsam durch eine Säule (4 × 60 cm) Sephadex G 10, welches man in derselben Lösung über Nacht hatte vorquellen lassen. Die Verfolgung der UV-Extinktion bei 254 nm im Eluat zeigt 2 Peaks. Im ersten Peak ist fast das gesamte Insulin vereinigt. Die entsprechenden Fraktionen werden gesammelt und lyophilisiert. Ausb. 750 mg.

Zur Reinigung durch Verteilungschromatographie an Sephadex® LH 20 im System *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (8:4:40) wird eine Säule (2.5 × 200 cm) nach l. c.⁵⁾ gefüllt. Das vorgereinigte *Msc*₂-Insulin wird in 5 ml Unterphase gelöst und auf die Säule aufgetragen.

Die Elution mit Unterphase ergab im vorliegenden Fall das Elutionsdiagramm nach Abb. 2. Die Fraktionen wurden, wie in Abb. 2 angegeben, zusammengefaßt und zeigten bei der elektrophoretischen Prüfung das in Abb. 3 wiedergegebene Bild.

¹⁶⁾ H.-D. Cremer und A. Tiselius, *Biochem. Z.* **320**, 273 (1950).

Die Ausbeuten betragen in

- Frakt. 1 10 mg Insulin + Msc-Insulin etwa 1:1
- 2 42 mg Msc-Insulin
- 3 15 mg Msc-Insulin + Msc₂-Insulin etwa 2:1
- 4 480 mg Msc₂-Insulin
- 5 18 mg Msc₂-Insulin + Msc₃-Insulin etwa 4:1
- 6 80 mg Msc₃-Insulin

2. Rinderinsulin

Für die Abspaltungversuche wurde vorgereinigtes Msc₂-Insulin eingesetzt, das noch Msc- bzw. Msc₃-Insulin enthält.

a) *Abspaltung der Msc-Gruppen bei pH ≈ 10.5*: 90 mg (15 μmol) vorgereinigtes Msc₂-Insulin wurden in einer Mischung aus 1 ml Wasser, 0.5 ml Dioxan, 0.5 ml Methanol und 0.15 ml 2 N NaOH bei 0°C gelöst. Nach 0.5, 1, 2, 5, 10 und 20 min wurde ein aliquoter Teil entnommen, mit je 2 Tropfen Essigsäure neutralisiert und der Papierelektrophorese bei pH 2 unterworfen. Ergebnis siehe Abb. 4.

b) *Abspaltung der Msc-Gruppen bei pH ≈ 13*: 90 mg (15 μmol) vorgereinigtes Msc₂-Insulin wurden in 1.75 ml Dioxan/Wasser (1:1) unter Zusatz von 0.25 ml 2 N NaOH bei 0°C gelöst. Nach 0.5 und 1 min wurden aliquote Teile entnommen, mit je 4 Tropfen Essigsäure neutralisiert und wie oben der Papierelektrophorese bei pH 2 unterworfen. Ergebnis siehe Abb. 5.

c) *Abspaltung der Msc-Gruppen und Reinigung des Rinderinsulins an Sephadex® G 50 superfine*: 200 mg (33 μmol) vorgereinigtes Msc₂-Insulin wurden nach b) von den Schutzgruppen befreit. Nach 30 s Einwirkung der Natronlauge bei 0°C wurde mit Essigsäure auf pH 3 gestellt und i. Vak. auf etwa das halbe Vol. eingengt. Die Lösung wurde auf eine Säule (2.5 × 100 cm) Sephadex G 50 superfine (5proz. Essigsäure als Quellmittel) aufgetragen. Elution durch 5proz. Essigsäure. Es erschien nur ein Peak, von dem ein Vorlauf (15 mg) und ein Nachlauf (10 mg) abgeschnitten wurde. Die Hauptmenge wurde lyophilisiert (Ausb. 145 mg) und bei pH 5.4 aus Citratpuffer kristallisiert¹⁷⁾.

¹⁷⁾ J. Schlichtkrull, Acta Chem. Scand. 10, 1459 (1956).