

FRAKTIONIERUNG HANDELSÜBLICHEN INSULINS (IV) GEWINNUNG HOCHGEREINIGTEN INSULINS MIT HILFE DER POLYACRYLAMID-DISC-ELEKTROPHORESE UND ERMITTLUNG SEINER HYPOGLYKÄMISCHEN AKTIVITÄT

H. ZÜHLKE, H. G. LIPPMANN, W. WILKE, Ruth MENZEL und Rosemarie HILDMANN

*Institut für Diabetes "Gerhardt Katsch", Karlsburg/Greifswald, DDR
Bereich experimentelle Diabetesforschung*

Received 10 November 1969

From proinsulin-free insulin we obtained maximal purified insulin by means of preparative polyacrylamide electrophoresis (PADE). This substance appears in the analytical PADE as a uniform band and possesses glycine and phenylalanine as *N*-terminal amino acids. By use of the eviscerated rabbit as testing model, the product displays a higher hypoglycemic activity as compared with the Toronto standard.

1. Einleitung

Durch Gelchromatografie von kommerziellem Rinderinsulin an Sephadex G 50 gelang auch uns [1, 2] die Gewinnung von Proinsulin. Nachdem wir feststellten, daß das auf die angegebene Weise gewonnene Proinsulin mit Hilfe der analytischen Polyacrylamid-Disc-Elektrophorese (PADE) in weitere Fraktionen zerlegbar ist (Abb. 2a vgl. [3]), konnten wir diese Komponenten unter Verwendung der präparativen PADE [4] gewinnen.

Auch das proinsulinfreie Insulin, wie es durch 2 malige Gelchromatografie über Sephadex G 50 gewonnen wurde, stellt nach Ergebnissen der analytischen PADE noch kein einheitliches Produkt (Abb. 2b) dar. Zur weiteren Reinigung setzten wir wiederum die präparative PADA ein [5].

2. Material und Methoden

Zehnmals umkristallisiertes Rinder-Insulin erhielten wir vom VEB Berlin-Chemie.

Die Auftrennung erfolgte in einer mit Trägergel (Chemikalien der Firma Serva Heidelberg, p.a.) gefüllten, von außen und innen mit Wasser gekühlten, zylindrischen Säule (Trenngel: 50 ml). Das Gelsystem,

das einen pH-Wert von 8,9 aufwies, wurde wie für die analytische PADE hergestellt [3, 4]. In das Substanzgel wurden 80–100 mg proinsulinfreies Insulin einpolymerisiert. Zur Durchführung der Elektrophorese benutzten wir einen Elektrodenpuffer der Zusammensetzung 6 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) und 30 g Glycin pro 1 und eine während des Laufs konstant bleibende Stromstärke von 60 mA (Δ 180–400 V). Während der Auftrennung wanderten die Fraktionen aus dem Gel hintereinander in eine flache Elutionskammer, durch die der Elutionspuffer (Zusammensetzung: 52 g TRIS, 14 ml konzentrierte Essigsäure/1) in einer Geschwindigkeit von 10 ml/h strömte und die einzelnen Fraktionen über das Durchflußphotometer Uvicord II (Fa. LKB Produkter Stockholm) einem Fraktionssammler zuführte.

Die erhaltenen Fraktionen wurden lyophilisiert, über Sephadex G 25 (Pharmacia Uppsala) mit 0,05 m Ammoniumformiat entsalzt, wiederum lyophilisiert und das restliche Ammoniumformiat durch vorsichtige Sublimation mit einer Infrarotlampe bei einem Druck von ca. 0,1 mm Hg entfernt.

Die Bedingungen für die analytische PADE sind in Lit. [3] ausführlich beschrieben. Die Anfärbung der Gele erfolgte mit Amidoschwarz 10 B.

Die N-terminalen Endgruppen bestimmten wir nach

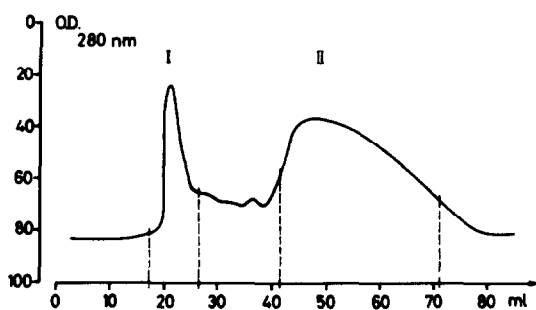


Abb. 1. Trennung von proinsulinfreiem Insulin mit Hilfe der präparativen Polyacrylamid-Disc-Elektrophorese.

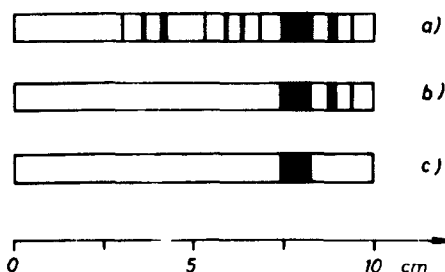


Abb. 2. Analytische Polyacrylamid-Disc-Elektrophorese. Aufgetragen: 0,2 mg Protein pro Gel. (a) 10 X umkristallisiertes Rinderinsulin (VEB Berlin-Chemie), (b) Proinsulinfreies Insulin (erhalten nach 2 X iger Gelchromatografie über Sephadex G 50), (c) Fraktion II (vgl. Abb. 1).

der DNP-Methode [6]. Die Hydrolyse des Proteins wurde in 6 n Salzsäure unter Stickstoff vorgenommen, die Hydrolysezeit betrug 10 Stunden. Die erhaltenen DNP-Aminosäuren trennten wir dünnschichtchromatografisch auf Kieselgel G (Fa. Merck Darmstadt) auf.

Der Wassergehalt der Proteine wurde nach 10-stündigem Trocknen bei 100°C in einer Trockenpistole (P_2O_5 als Trockenmittel) bestimmt. Den Stickstoffgehalt ermittelten wir nach Lit. [7] und den Zinkgehalt nach Veraschen der Substanz im Platintiegel polarografisch [8].

Die Testung der Fraktion II auf hypoglykämische Aktivität wurde im Vergleich zum Toronto-Standard 1958 (vgl. [9] *) und zum Präparat vom VEB Berlin-

Chemie am eviscerierten, nephrektomierten Kaninchen unter kontinuierlicher Glukoseinfusion [10, 11] vorgenommen.

Nach dem Prinzip des Paarvergleiches erhielten die Tiere je 20 µg der Fraktion II oder eines der beiden Vergleichspräparate in 1 ml NaCl 0,9%/kg KG i.v.; dabei fand eine stets frisch bereitete Injektionslösung aus einem mit n/4000 HCl hergestellten Standardansatz der Präparate Verwendung. Als Maß der Effektivität diente die Änderung der Neigung der Geraden für die Blutglukosewerte in der Testperiode gegenüber der Vorperiode. Es wurde als φ_E errechnet [10, 11] und ist ein Ausdruck für die aus der Blutbahn eliminiertes Glukose.

3. Ergebnisse und Diskussion

Mit Hilfe der präparativen PADE erhielten wir für die Auftrennung des proinsulinfreien Insulins eine Extinktionskurve, wie sie in Abb. 1 dargestellt ist.

Nach Entsalzung und Lyophilisierung erfolgte die nähere Charakterisierung der erhaltenen, mit I und II bezeichneten Hauptfraktionen.

Zunächst wurde die analytische PADE eingesetzt (Abb. 2). Danach erhielten wir für Fraktion II ein im elektrischen Feld einheitlich wanderndes Produkt. Wie die Bestimmung der Endgruppen nach der DNP-Methode zeigte, lagen in dieser Fraktion die N-terminalen Aminosäuren Glycin und Phenylalanin vor.

PADE und Endgruppenbestimmung deuten daraufhin, daß es sich bei Fraktion II um Insulin (evtl. verunreinigt durch Desalanin-Insulin, das durch die PADE vom Insulin nicht zu trennen ist, aber eine dem Insulin entsprechende biologische Aktivität aufweist) handelt.

In der folgenden Tabelle sind Wasser-, Stickstoff- und Zinkgehalt von zehnmaliges umkristallisiertem Insulin, dem aus der PADE gewonnenen Insulin und dem zur Zeit gültigen Toronto-Standard miteinander verglichen (Tab. 1).

Die aus der präparativen PADE erhaltene Fraktion I (Abb. 1) stellt kein Protein dar. Bei dieser Substanz handelt es sich im wesentlichen um einen Zink-Glycinat-Komplex (vgl. [12]), wie durch PADE-Versuche mit eingesetztem $ZnSO_4$ und durch Endgruppenbestimmung nachgewiesen werden konnte. Bei Durchführung der letztgenannten Methode er-

* Wir danken Herrn Oberpharmazierat Gerecke, stellv. Direktor des Deutschen Instituts für Arzneimittelwesen Berlin für die Beschaffung dieses Präparates.

Tabelle 1

	Insulin 10 X umkrist.	Insulin Fraktion II	Insulin Toronto- Standard
Wassergehalt (%)	7,10	10,12	—
N-Gehalt (%)	14,45	14,62	14,50
Zn-Gehalt (%)	0,45	< 0,03	—

— = nicht bestimmt.

Tabelle 2

Insulin	Dosis ($\mu\text{g/kg}$)	<i>n</i>	$\varphi_E(^{\circ})$	$\Delta\varphi_E(^{\circ})$
Toronto-Standard	20	5	29,8	15,6
Fraktion II	20	4	45,4	
VEB Berlin-Chemie	20	4	33,2	20,8
Fraktion II	20	5	54,0	

hielten wir nach Umsetzung der Fraktion I mit 2,4-Dinitrofluorbenzol und 1. anschließender Hydrolyse sowie 2. ohne hydrolytische Spaltung im Dünnschichtchromatogramm je einen dem DNP-Glycin entsprechenden einheitlichen Fleck.

Die hypoglykämische Aktivität der Fraktion II zeigt sowohl gegenüber der des Toronto-Standards, als auch der des zehnmaliges umkristallisierten Rinder-Insulins (VEB Berlin-Chemie) deutlich höhere Werte (Tab. 2). Dabei ist der N-Gehalt aller drei Präparate praktisch identisch und der Wasseranteil nur geringfügig verschieden. Unter Berücksichtigung der von uns mitgeteilten Regression [11] würde dies einer

erheblichen Steigerung der gewichtsbezogenen hypoglykämischen Wirksamkeit des von uns mittels PADE höchstgereinigten Insulins entsprechen. Über endgültige quantitative Vergleiche mit Einsatz eines Dosisspektrums werden wir an anderer Stelle [13] ausführlich berichten. Die Befunde fordern zu einer Revision des Toronto-Standards und zu einer Diskussion der Frage heraus, ob die Wirksamkeitsangabe von Insulinpräparaten in IE nicht bald verlassen werden sollte.

Literatur

- [1] D.F.Steiner, Trans. N.Y. Acad. Sci. Series II, 30 (1967) 60.
- [2] H.Zühlke und J.Behlke, FEBS Letters 2 (1968) 130.
- [3] H.Zühlke, H.G.Lippmann und W.Wilke, Acta Biol. Med. German. 23 (1969) 361.
- [4] H.Zühlke und W.Wilke, Acta Biol. Med. German. 23 (1969) K 5.
- [5] H.Zühlke, H.G.Lippmann, U.Karg und W.Wilke, Int. Peptidsymp. 16, 18.5.1969 in Halle, 1969 a.
- [6] G.Pataki, in: Dünnschichtchromatografie in der Aminosäure- und Peptidchemie (Walter de Gruyter, Berlin, 1966).
- [7] J.Kjeldahl, Z. Anal. Chem. 22 (1883) 366.
- [8] P.Přibil und Z.Roubal., Collection Czech. Chem. Commun. 18. (1953) 366.
- [9] A.H.Lacey, Diabetes 17 (1968) 705.
- [10] H.G.Lippmann und H.Hommel, Acta Biol. Med. German. 21 (1968) 723.
- [11] H.G.Lippmann und H.Hommel, Acta Biol. Med. German. 22 (1969) 23.
- [12] K.Brunfeldt, Science Tools 12 (1965) 5.
- [13] H.G.Lippmann, H.Hommel, H.Zühlke und Ruth Menzel, Arzneimittelstandardisierung, im Druck.