

REFERENCES

- [1] *A. C. Jain, V. K. Khanna & T. R. Seshadri*, *Tetrahedron*, **25**, 275 (1969).
- [2] *J. Polónia & M. A. Polónia*, XXIX Congresso Luso-Espanhol para o Progresso das Ciências, Lisboa, 1970.
- [3] *P. K. Grover, G. D. Shah & R. C. Shah*, *J. chem. Soc.* **1955**, 3982.
- [4] *J. R. Lewis & J. B. Reary*, *J. chem. Soc. (C)* **1970**, 1662.
- [5] *H. D. Locksley, I. Moore & F. Echeinmann*, *J. chem. Soc. (C)*, **1966**, 2265.
- [6] *E. D. Burling, A. Jefferson & F. Scheinmann*, *Tetrahedron* **21**, 2653 (1965).
- [7] *K. R. Markham*, *Tetrahedron* **21**, 3687 (1965).
- [8] *O. R. Gottlieb, M. Taveira Magalhães, M. Camey, A. A. Lins Mesquita & D. de Barros Corrêa*, *Tetrahedron* **22**, 1777 (1966).
- [9] *O. R. Gottlieb, M. Taveira Magalhães & G. M. Stefani*, *Tetrahedron* **22**, 1785 (1966).
- [10] *L. J. Haynes & D. R. Taylor*, *J. chem. Soc. (C)*, **1966**, 1685.
- [11] *P. Rivaille, J. Massicot, M. Guyot & V. Plouvier*, *Phytochemistry* **8**, 1533 (1969).
- [12] *O. R. Gottlieb, A. A. Lins Mesquita, G. C. Oliveira & M. Teixeira de Melo*, *Phytochemistry* **9**, 2537 (1970).
- [13] *S. J. Gabriel & O. R. Gottlieb*, *Phytochemistry* **11**, 3035 (1972).
- [14] *K. Hostettmann, R. Tabacchi & A. Jacot-Guillarmod*, *Helv.* **57**, 294 (1974).
- [15] *D. Barraclough, H. D. Locksley, F. Scheinmann, M. Taveira Magalhães & O. R. Gottlieb*, *J. chem. Soc. (B)* **1970**, 603.

288. Totalsynthese von Humaninsulin unter gezielter Bildung der Disulfidbindungen

Vorläufige Mitteilung^{1) 2)}

von **Peter Sieber, Bruno Kamber, Albert Hartmann, Albert Jöhl, Bernhard Riniker** und **Werner Rittel**

Chemische Forschungslaboratorien der Division Pharma der *Ciba-Geigy AG.*, Basel

(20. XI. 74)

Summary. A preliminary account is given of a total synthesis of human insulin involving directed formation of the three disulfide bonds at different stages of the fragment-condensation approach. The synthesis was facilitated by the application of two new methods for the selective removal of protecting groups. In the first, two S-Trt-protected cysteine residues are converted to the disulfide without affecting S-Acm-protected cysteine residues. The second new method consists in a very mild, pH-controlled, acidolysis of N(α)-Trt, leaving intact N(α)-Bpoc and other acid-labile protecting groups. The last step of the synthesis was the formation of the disulfide bridge between the Acm-protected cysteine residues A7 and B7 by iodine. Extensive counter-current distribution yielded the synthetic hormone in pure form. It was compared and found to be identical with natural human insulin. Identification was achieved by means of thinlayer chromatography and electrophoretic procedures, as well as by comparing the pattern of breakdown by enzymes (finger-printing). The natural and synthetic hormones were crystallized under identical conditions. The synthetic human insulin was found to possess full biological activity in an *in vitro* system.

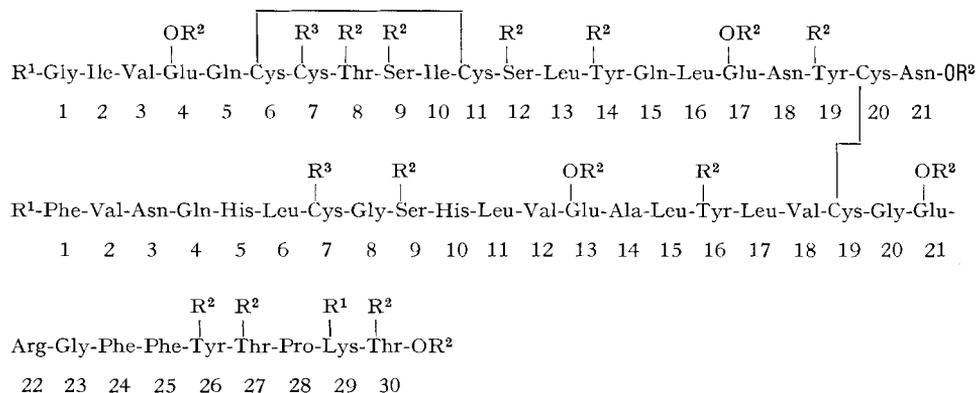
¹⁾ Eine ausführliche Beschreibung soll später in dieser Zeitschrift erfolgen.

²⁾ Zu der hier verwendeten, abgekürzten Schreibweise für Aminosäuren, Peptide und ihre Derivate vgl. [1]; ferner bedeuten: Acm-: Acetamidomethyl-[2], Boc-: *t*-Butyloxycarbonyl-Bpoc-: 2-(*p*-Biphenyl)-isopropylloxycarbonyl-[3], But: *t*-Butyl-, HOBT: 1-Hydroxybenzotriazol, TFA: Trifluoressigsäure, TFEt: Trifluoräthanol, Trt-: Triphenylmethyl-, MV.: multiplikative Verteilung, *K* = Verteilungs-Koeffizient.

Grundlegende Untersuchungen in den Laboratorien von *Zahn, Du* und *Katsoyannis* haben verschiedene Insulinsynthesen ermöglicht (Übersicht: vgl. [4]). Bei allen bisherigen Synthesen wird als letzter Schritt die Verknüpfung der beiden getrennt aufgebauten Ketten ausgeführt. Wegen dieser ungezielten Verknüpfung entstehen unerwünschte Iso- und Polymere und die Ausbeuten sind niedrig.

Im Folgenden beschreiben wir in Kürze eine Totalsynthese von Humaninsulin [5] (Formel I, *Schema 1*) in der zum erstenmal die drei Disulfidbrücken gezielt gebildet worden sind. Ihre Verknüpfung erfolgte auf verschiedenen Stufen eines fragmentweisen Aufbaues. Ein solcher Syntheseweg stellt hohe Anforderungen in Bezug auf die Selektivität der Schutzgruppen und wurde nur durch das Auffinden neuer Methoden ermöglicht: einerseits zur selektiven Reaktion von S-Trt-Gruppen mit Jod neben S-Acm-Gruppen [6], anderseits zur pH-kontrollierten Acidolyse von N(α)-Trt- neben N(α)-Boc-Gruppen [7].

Schema 1. *Formeln von Humaninsulin (I) [5] und der grossen H-Peptide IIa und IIb*



I: Humaninsulin, R¹ = R² = H; anstelle von R³ Disulfidbindung Cys (A)⁷-Cys (B)⁷.

IIa: grosses, geschütztes H-Peptid, R¹ = Boc, R² = But, R³ = Acm.

IIb: grosses, freies H-Peptid, R¹ = R² = H, R³ = Acm.

Im Verlauf der Synthese beobachteten wir Schwerlöslichkeit oder Tendenz zur Assoziation der geschützten Zwischenprodukte, welche die B-Kettensequenz 1-16 enthielten. Diese konnten, besonders die Vorendstufe IIb (vgl. *Schema 1*), nur schwer gereinigt und analysiert werden, im Gegensatz zum Insulin selbst.

In der Schluss-Stufe wurde die letzte Disulfidbindung durch Oxydation der S-Acm-Derivate der Cysteinreste A7 und B7 in IIb mittels Jod [8] geschlossen. Die aus IIb erhaltenen Oxydationsgemische enthielten nach dünnschichtchromatographischer Schätzung und biologischer Evaluation ungefähr 40% I. Da das zur Oxydation eingesetzte IIb noch Nebenprodukte enthielt, dürfte die Ausbeute an I, ausgehend von reinerem IIb, merklich höher liegen³⁾.

³⁾ Vorversuche haben gezeigt, dass I auch durch umgekehrte Reaktionsfolge aus IIa erhalten werden kann, nämlich Oxydation mit J₂ als erster Schritt und nachfolgende acidolytische Abspaltung der Schutzgruppen. Über diese Synthesevariante wird später berichtet.

Man reinigte IIIa mittels MV. im System Methanol/0,1M Ammoniumacetat (pH = 7,0)/CHCl₃/CCl₄ 10:3:5:4, $K = 0,02$. Dann wurde die Trt-Gruppe an Leu (B)¹⁷ selektiv entfernt durch Einwirkung von HCl in 90% TFET bei «pH» = 3,5–4,0 (pH-Stat-Reaktion; «pH»: scheinbarer pH-Wert der Glaselektrode). Das dabei erhaltene Derivat IIb wurde mittels DCCI-HOBT mit dem restlichen B-Kettenteil 1–16, Boc-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys(Acm)-Gly-Ser(But)-His-Leu-Val-Glu(OBut)-Ala-Leu-Tyr(But)-OH gekuppelt. Dies führte zur geschützten Sequenz A(14–21)–B(1–30). Sie wurde mittels MV. im gleichen System wie IIIa gereinigt, $K = 0,03$. Dann entfernte man die Bpoc-Gruppe an Tyr(A)¹⁴ durch HCl in 90% TFET bei «pH» = 0,5–1 unter Erhalt der übrigen Schutzgruppen. Zur Vervollständigung der A-Kette wurde jetzt mittels DCCI-HOBT mit dem Fragment 1–13 (VII, *Schema 3*) gekuppelt. In VII liegt der Disulfidring A(6 → 11) bereits geschlossen vor. Die Herstellung von VII erfolgte nach *Schema 3*.

Zur selektiven Bildung des Disulfidrings aus den Trt-geschützten Cysteinresten oxydierte man die Sequenz 6–13 (IV) mit J₂ in TFET [6] unter Zusatz von CH₂Cl₂ als Lösungsvermittler. Der weitere Aufbau erfolgte nach *Schema 3*; VII reinigte man mittels MV. im System Methanol/0,05M Ammoniumacetat (pH 4,7)/CHCl₃/CCl₄ 10:3:8:4, $K = 0,58$.

Das grosse H-Peptid IIa wurde durch Kupplung von VII mit der Sequenz A(14–21)–B(1–30) erhalten und durch MV. gereinigt im System Methanol/Puffer/CHCl₃/CCl₄ 20:6:11:9; Puffer: 60 g Essigsäure, 7,7 g Ammoniumacetat, 1L Wasser, $K = 0,05$.

Die Hauptmenge von IIa (Gewichtmaximum aus MV.) befreite man durch Acidolyse (95% TFA, 30 Min., 25°) von den *t*-Butylschutzgruppen und reinigte IIb durch MV. im System Butanol/Pyridin/0,02% Essigsäure 5:3:11, $K \sim 0,9$. Auch nach 900 Verteilungsschritten war das erhaltene IIb noch merklich verunreinigt.

Reihenversuche im Mikromasstab ergaben als bisher beste Bedingung zur oxydativen Überführung von IIb in synthetisches Humaninsulin I: Behandlung in 10⁻⁴M Lösung mit 100M Überschuss J₂ in 60% Essigsäure (5–10 Min. bei 25°). Zur Aufarbeitung reduzierte man den J₂-Überschuss mit Ascorbinsäure und entsalzte an Sephadex G 25.

Zur präparativen Gewinnung von I vereinigte man verschiedene Oxydationsansätze (total 170 mg Rohprodukt) und unterwarf einer MV. im System Butanol/Pyridin/0,1% Essigsäure 5:3:11 über 1000 Verteilungsschritte, $K = 0,93$. Nach dünnstichtchromatographischer Reinheitskontrolle wurden die reinsten Fraktionen (73 mg) vereinigt und weiter gereinigt durch MV. im System *t*-Butylalkohol 1M Ammoniumacetat (pH = 7,0)/CHCl₃ 10:10:0,5 über 1650 Schritte, $K = 0,28$. Die Ausbeute an reinem I betrug 40 mg.

Charakterisierung des synthetischen Humaninsulins. – *Aminosäureanalyse* (Hydrolyse: 6N HCl enthaltend 0,1% Phenol, 27 Std., 110° (theoret. Werte in Klammern): Lys 0,92 (1); His 2,07 (2); Arg 1,09 (1); Asp 3,14 (3); Thr 2,88 (3); Ser 2,75 (3); Glu 7,04 (7); Pro 1,09 (1); Gly 4,00 (4); Ala 0,97 (1); ¹/₂ (Cys)₂ 5,85 (6); Val 3,95 (4); Ile 1,53⁵ (2); Leu 5,68 (6); Tyr 4,20 (4); Phe 3,17 (3).

*Biologische Aktivität*⁶). Synthetisches I zeigte bei der *in vitro* Testierung (Glucose-Oxydation an isolierten epididymalen Rattenfettzellen) gleiche Aktivität wie Schweineinsulin.

Synthetisches und natürliches I wurden mit den im Folgenden aufgeführten Analysemethoden verglichen, wobei sich übereinstimmende Ergebnisse für die beiden Verbindungen zeigten (vgl. Bilder 1–4).

Dünnstichtchromatographie auf Celluloseplatte: System 155 (*n*-Amylalkohol/Pyridin/Methyläthylketon/Ameisensäure/H₂O 40:28:11:5:15), R_f = 0,18. System 112E (Butanol/Pyridin/Ameisensäure/H₂O 44:24:2:20), R_f = 0,35. Zum Vergleich wurde zusätzlich natürliches Schweineinsulin mitchromatographiert: R_f (155) = 0,20; R_f (112E) = 0,37.

Elektrophorese auf Celluloseacetatfolie: pH 1,9 (1,67M Essigsäure + 0,7M Ameisensäure), 90 Min., 20 V/cm: Laufstrecke 10 cm kathodisch. pH 8,6 (Veronalpuffer, enthaltend 0,28% EDTA + 25% Harnstoff), 90 Min. 20 V/cm: Laufstrecke 5,5 cm anodisch.

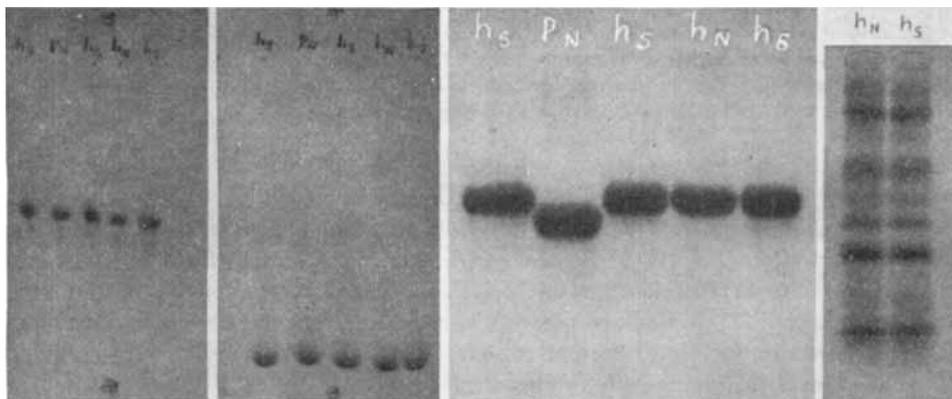
⁵) Dieser tiefe Wert ist durch die hohe Hydrolyseresistenz des Dipeptides IIc²-Val³ (A-Kette) bedingt.

⁶) Hr. Dr. F. Märki danken wir bestens für die Überlassung der Versuchsergebnisse.

Disc-Elektrophorese (pH 8,3) und isoelektrische Fokussierung (Ampholin pH 3,5–10; 5,5M Harnstoff) zeigten identisches Verhalten für natürliches und synthetisches I, wobei auch die 1:1-Mischung dieser beiden keine Verbreiterung der Banden erkennen liess.

Enzymabbau. 1proz. Insulinlösungen in 0,2M NH_4HCO_3 wurden mit Subtilisin oder Chymotrypsin während 3 Std. bzw. mit Trypsin während 8 Std. bei 37° inkubiert (Enzymkonz. = 0,04%) und die Abbauprodukte dünn-schichtchromatographisch verglichen.

Kristallisation. Nach Auflösen von I in 0,095M Citratpuffer (pH 6,0), der zusätzlich 0,03M an NaCl und 0,012M an ZnCl_2 ist und 5 Vol % *t*-Butylalkohol enthält, kristallisierte bei Raumtemperatur Zink-Insulin in schönen, rhombischen Kristallen aus.



Vergleich verschiedener Insuline: hs = human, synthetisch; hn = human, natürlich; pn = porcine, natürlich. *Bild 1.* Celluloseacetat-Elektrophorese bei pH 8,6; *Bild 2.* Celluloseacetat-Elektrophorese bei pH 1,9; *Bild 3.* Dünnschichtchromatographie auf Celluloseplatte, System 155; *Bild 4.* Dünnschichtchromatographie nach Abbau mit Subtilisin, System 112E. (Details s. Text)

Für wertvolle technische Mitarbeit danken wir Frau *V. von Arx* und Frau *I. Zimmermann* sowie den Herren *W. Beck*, *H. R. Keller* und *A. Stauffer*.

Die analytischen Methoden wurden in verdankenswerter Weise in unserem Chromatographie-laboratorium (Leiter: Herr *E. von Arx*) durch Frau *M. Deyber*, Fr. *A. Grosshans*, Fr. *J. Keller* sowie die Herren *D. Faupel*, *A. Linder* und *W. Morgenthaler*, ausgeführt.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochim. biophys. Acta* **121**, 1 (1966).
- [2] *D. F. Veber, J. D. Milowski, R. G. Denkwalter & R. Hirschmann*, *Tetrahedron Letters* **1968**, 3057.
- [3] *P. Sieber & B. Iselin*, *Helv.* **51**, 622 (1968).
- [4] *K. Lübke & H. Klostermeyer*, *Advances in Enzymology* **33**, 445 (1970).
- [5] *D. S. H. W. Nicol & L. F. Smith*, *Nature* **187**, 483 (1960).
- [6] *A. Hartmann, B. Kamber, B. Riniker, W. Rittel & P. Sieber*, unveröffentlichte Resultate.
- [7] *B. Riniker, P. Sieber, B. Kamber & W. Rittel*, in Vorbereitung.
- [8] *B. Kamber*, *Helv.* **54**, 927 (1971).
- [9] *R. G. Romans*, *Rec. Progr. Hormone Res.* **10**, 241 (1954).
- [10] *W. König & R. Geiger*, *Chem. Ber.* **103**, 788 (1970).
- [11] *B. Kamber*, *Helv.* **56**, 1370 (1973).