

4. Totalsynthese von Humaninsulin¹⁾. IV²⁾. Beschreibung der Endstufen³⁾

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

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

(11. XI. 76)

Total synthesis of human insulin. IV. Description of the final steps.

Summary

Recently a preliminary account was given of a new synthetic pathway leading to human insulin. In the present report the last steps of this synthesis – *i.e.* as from the unsymmetrical cystine derivative I – are described in detail. I contains the sequences A(14–21) and B(17–30), linked by the disulfide bridge A20–B19. These last steps are: 1) selective removal by pH-controlled acidolysis in trifluoroethanol of *N*(α)-Trt from leucine B17, 2) completion of the B-chain by coupling with the fragment B(1–16), 3) selective removal by trifluoroethanol of *N*(α)-Bpoc at tyrosine A14, 4) completion of the A-chain by coupling with the cyclic fragment A(1–13), 5) removal of the acid labile protecting groups, and 6) formation of the disulfide bond A7–B7 from the two *S*-acetamido-protected cysteine residues by treatment with iodine.

As judged by the composition of the reaction mixture the closure of the 85-membered ring proceeds with a cyclization yield of over 70%. From the last step in the synthesis two products were obtained after extensive purification by counter-current distribution: pure human insulin in a yield of 50% and its [*D*-tyrosine B16]Isomer in a yield of 25%. Although the partial racemization of tyrosine B16 occurred during coupling with sequence B(1–16), the [*D*-tyrosine B16]-stereoisomer could only be separated at the endproduct stage.

The available evidence indicates that the ease of formation of the disulfide bond A7–B7 does not depend on the precursor molecule already having an insulin-like conformation.

¹⁾ Vorläufige Mitteilung siehe [1].

²⁾ III: siehe [2].

³⁾ Zur hier verwendeten Kurzschreibweise für Aminosäuren, Peptide und ihre Derivate vgl. [3]; weitere Abkürzungen: Acm: Acetamidomethyl [4]; Boc: *t*-Butyloxycarbonyl; Bpoc: 2-(*p*-Biphenyl)-isopropoxyloxycarbonyl [5]; Bu^t: *t*-Butyl; DMF: Dimethylformamid; HOAc: Essigsäure; HOBT: 1-Hydroxybenzotriazol; K: Verteilungszahl; TFA: Trifluoressigsäure; TFEt: Trifluoräthanol; Trt: Triphenylmethyl.

1. Einleitung. – In einer vorläufigen Mitteilung [1] haben wir einen neuen Syntheseweg zu Insulinpeptiden beschrieben, ausgearbeitet am Beispiel des Humaninsulins (X) [6]. Die ausführliche Beschreibung der Synthese wurde wegen der grossen Anzahl (102) chemischer Stufen in mehrere Teile gegliedert. Kürzlich berichteten wir über den Aufbau des Fragments A(1–13) (VI) [7] und des kleinen H-Peptids⁴⁾ (I) [2]. Nachfolgend geben wir eine detaillierte Beschreibung der sechs letzten Stufen der Synthese (vgl. *Schema 1* und *2*).

Ausgangspunkt des hier beschriebenen Teils der Synthese ist das kleine H-Peptid I, in dem die Disulfidbindung A20–B19 bereits enthalten ist. Der Aufbau mit Fragmenten, die bereits vorgebildete Disulfidfunktionen besitzen, ist ein wesentliches Merkmal dieser Synthese. Dieses Prinzip ist auch von *Zahn & Schmidt* [9] sowie *Hiskey et al.* [10] bei der Synthese von Insulinfragmenten verwendet worden. Es ist zwar bekannt, dass sich unsymmetrische Cystinpeptide durch Disulfidaustausch isomerisieren können, doch haben wir im Verlaufe der hier beschriebenen Synthese keine auf dieser Reaktion beruhende Instabilität der offenkettigen, unsymmetrischen Disulfide I, II, IV, V, VII, und VIII beobachtet.

2. Aufbau des geschützten, grossen H-Peptids VII. – Der bei der Synthese eingeschlagene Weg ist in *Schema 2* angegeben. Ausgangsmaterial war das geschützte kleine H-Peptid I [2]. Daraus liess sich die *N*(α)-Trt-Gruppe am Leucinrest B17 mit Hilfe der kürzlich [11] beschriebenen selektiven Acidolysemethode mittels HCl in 90proz. TFET während 5 Min. bei «pH 3,5» entfernen. Das entstandene Dihydrochlorid von II wurde zur Vervollständigung der B-Kette einer DCCI-HOBt-Kupplung [12] mit der Sequenz B(1–16) (III) unterworfen.

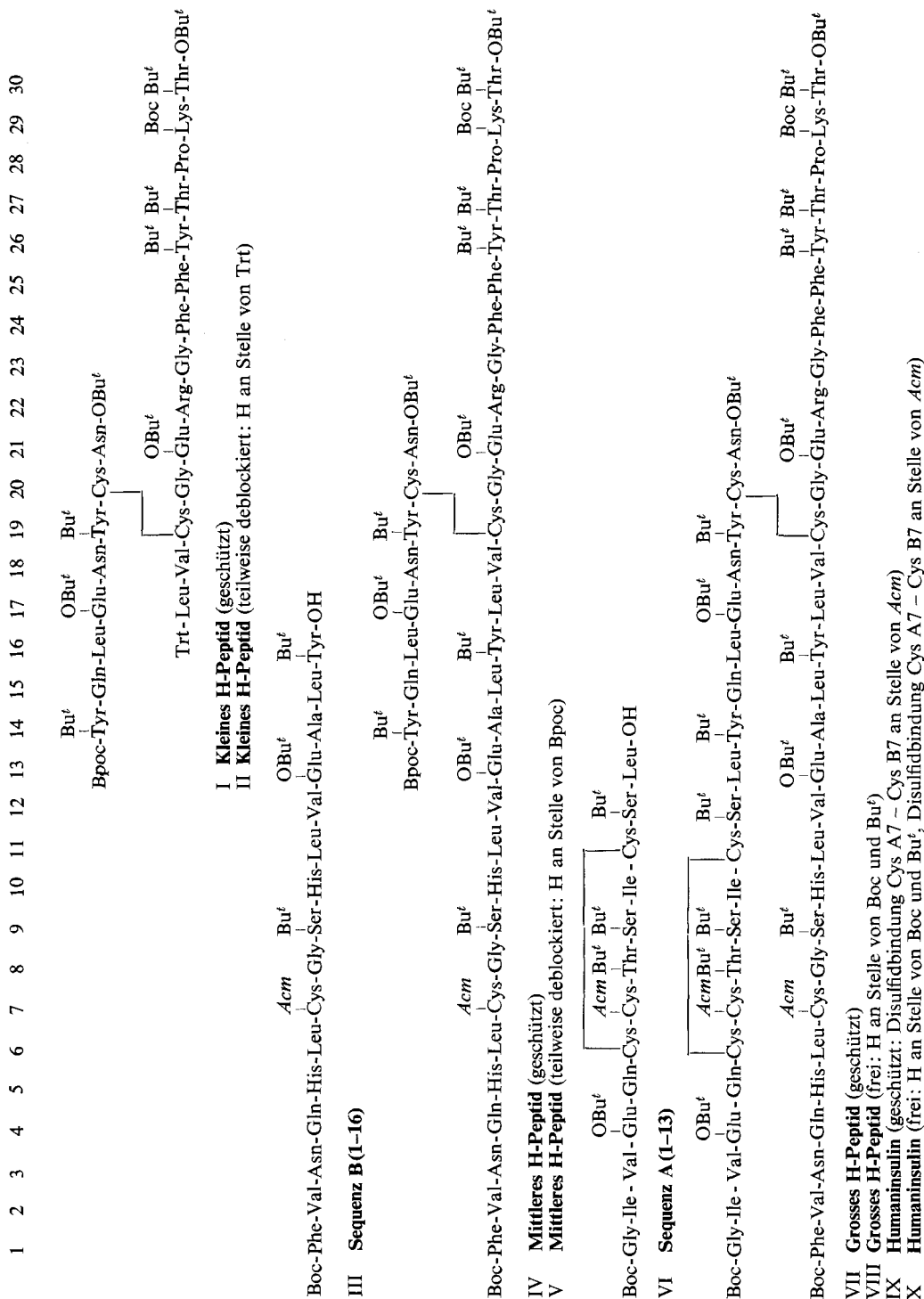
Das in DMF sehr schwerlösliche III ging in Gegenwart von II, offenbar unter Bildung eines löslichen Assoziates, in überraschend hoher Konzentration in Lösung. Die Kondensation war nach 24 Std. bei 0° zu ca. 90%, nach weiteren 15 Std. bei 25° quantitativ abgelaufen. Dabei bildeten sich ca. 20% *N*(Im)-Amidino-Histidinderivate [13]. Versuche zu deren Rückwandlung durch Erwärmen des Rohproduktes in Methanol misslangen, da IV dabei in einen aggregierten Gelzustand überging, der jegliche Analytik verunmöglichte. Aus dem gleichen Grund konnte IV nicht durch Gegenstromverteilung gereinigt werden.

In trifluoräthanolischer Lösung unterblieb die Aggregation, doch ist unter diesen Bedingungen die Bpoc-Gruppe bekannterweise instabil [11]. Die Schwierigkeiten wurden durch Behandlung von rohem IV in 90proz. TFET bei 60° umgangen, wobei gleichzeitig die Amidinogruppen der Histidinseitenketten und die Bpoc-Gruppe entfernt wurden. Das gebildete V liess sich durch Verteilung reinigen. Dass auch V noch teilweise assoziierte, wurde durch die Ausbildung eines breiten, unsymmetrischen Konzentrationspikis und die stetige Erhöhung des *K*-Wertes im Laufe der Verteilung angezeigt.

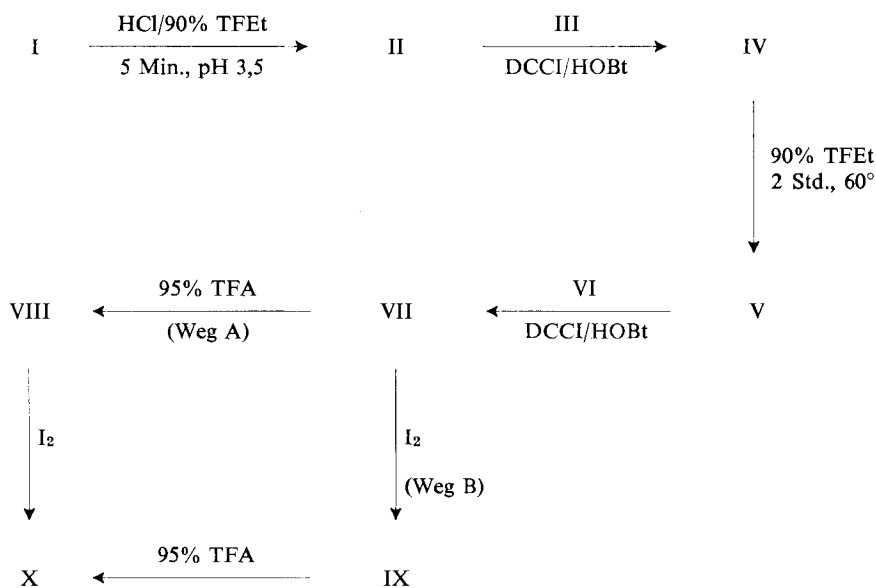
In Vorproben liess sich zeigen, dass der HOBt-Ester des in 30% Überschuss zur Kondensation eingesetzten Fragmentes III nur sehr schwer von V abgetrennt werden

⁴⁾ Bezeichnung nach *Zahn & Schmidt* [8] für Peptide, in denen Sequenzen der A- und B-Kette über die Disulfidbindung A20–B19 verbunden sind: kleine H-Peptide: A(14–21)–B(17–30); mittlere H-Peptide: A(14–21)–B(1–30); grosse H-Peptide: A(1–21)–B(1–30).

Schema 1



Schema 2



kann. Durch Umsatz mit 3-Dimethylamino-1-propylamin wurde er deshalb nach beendeter Kondensation in das entsprechende basische Amidderivat übergeführt, das sich in der Gegenstromverteilung sehr gut abtrennen liess. Während dieser Reinigung liessen sich auch Nebenprodukte abtrennen, die durch Kondensation von bereits in der Sequenz B(1–16) (III) enthaltenen Nebenprodukten mit II entstanden waren.

Bei der Kondensation von II und III, welche kein D-Tyrosin enthielten, entstanden durch partielle Racemisierung *ca.* 30% des [D-Tyrosin B16]-Derivates von IV, wie anhand von Inkubationsversuchen mit L-Aminosäure-oxydase nach saurer Totalhydrolyse gezeigt wurde. Dieses Nebenprodukt konnte auf der Stufe der Zwischenprodukte IV, V, VII und VIII weder dünnschichtchromatographisch nachgewiesen noch bei der Reinigung abgetrennt werden. Nach der Oxydation zum (freien) Insulin (X) zeigten sich aber bemerkenswerte Unterschiede des [D-Tyrosin B16]-Insulins gegenüber dem normalen Hormon, so dass sein analytischer Nachweis und die Abtrennung keine Schwierigkeiten mehr boten. Der unerwartet hohe Racemisierungsgrad dürfte auf der langsamen Acylierungsreaktion beruhen, bedingt durch sterische Hinderung an der Verknüpfungsstelle B16–B17.

Im letzten Kupplungsschritt der Synthese wurden V (in Form des Arginin B 22-Carbonates) und die A-Kettensequenz 1–13 (VI) mittels DCCI unter Zusatz von HOBt verknüpft. Die Reaktionsbedingungen waren praktisch gleich wie bei der analogen Kondensation von II und III zu IV, doch verlief die Kupplung merklich rascher. Nach beendeter Reaktion hatten sich geringere Mengen (5–10%) von N(Im)-Amidino-Histidinderivaten gebildet. Sie wurden hier durch Erwärmen in

TFEt/HOAc 20:1 gespalten. Für eine teilweise Racemisierung des C-terminalen Leucins (A13) fanden wir keine Hinweise.

Das geschützte grosse H-Peptid VII verhielt sich, wie V, bei der Gegenstromverteilung nicht ideal. Trotzdem konnten die dünnschichtchromatographisch erkennbaren Nebenprodukte im Laufe von 1000 Stufen praktisch quantitativ abgetrennt werden.

3. Humaninsulin X aus dem grossen H-Peptid VII bzw. VIII. – Da die Knüpfung der Disulfidbrücke A7–B7 als letzter Schritt der Synthese aus den S-Acm-geschützten Cysteinresten in VII oder VIII durch Oxydation mit Jod nach [14] erfolgen sollte, wurde zunächst in Modellversuchen abgeklärt, ob dabei Nebenreaktionen eintreten. Als solche wären möglich: a) Jodierung der freien oder geschützten Tyrosinreste sowie der Histidinreste, b) durch Jod katalysierter Disulfidaustausch, c) Angriff der bei der Jodoxydation intermediär gebildeten reaktiven Zwischenprodukte (Sulfonyljodide?) auf Disulfidbindungen. Die in Tabelle 1 angegebenen Modellsubstanzen wurden deshalb einer Behandlung mit überschüssigem Jod unterworfen. Die Resultate sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1. Verhalten verschiedener Substrate gegen Jod^{a)}

Substrat	Peptid-Konz. (mol/l)	Jod-Konz. (mol/l)	Methanol	Methanol/Wasser 9:1	Essigsäure/Wasser 4:1
Z-Asn-Tyr-OMe	10 ⁻²	10 ⁻¹	–	+++ ^{b)}	–
Z-Asn-Tyr(Bu ^t)-OMe	10 ⁻²	10 ⁻¹	–	–	–
Z-Val-His-OMe	10 ⁻¹	1,7 · 10 ⁻¹	+++ ^{b)}	+++ ^{b)}	+
Z-Val-His-OMe · 2HCl	10 ⁻¹	1,7 · 10 ⁻¹	–	–	–
Schweine-Insulin (Zn-frei)	10 ⁻³	3 · 10 ⁻²	–	+++	++
Schweine-Insulin · 3HCl, (Zn-frei) + 2 Äq.	–	–	–	–	–
Ac-Gly-Cys(Acm)-Gly-NH ₂	10 ⁻³	3 · 10 ⁻²	–	+++	–

^{a)} Reaktionsbedingungen: 1 Std., Raumtemp.; Prüfung im Dünnschichtchromatogramm. Es bedeutet: – : < 5%; + : 5–10%; ++ : 10–20%; +++ : > 20% Nebenprodukt.

^{b)} Bildung von Mono- und Dijodderivaten.

tate zeigen, dass unter Bedingungen, die eine vollständige Umsetzung von S-Acm erlaubten, in Essigsäure/Wasser keine Nebenreaktionen auftraten. Die Jodoxydation musste dabei in Gegenwart starker Säure durchgeführt werden, da sonst die Imidazolgruppen der Histidinreste zu einem geringen Teil jodiert wurden. Essigsäure/Wasser eignet sich gut zum Lösen freier und geschützter Peptide.

Wie im *Schema 2* dargestellt, sind zur Überführung des grossen, geschützten H-Peptids VII in Humaninsulin (X) zwei Wege offen: auf Weg A wurden zuerst die

acidolytisch abspaltbaren Schutzgruppen entfernt und hierauf im so erhaltenen, freien grossen H-Peptid VIII die Disulfidbrücke A7–B7 geschlossen. Auf Weg B wurde in umgekehrter Reihenfolge vorgegangen. Dabei bildete sich als Zwischenprodukt die geschützte Insulin-Vorstufe IX, in der die drei Disulfidbindungen in der richtigen Anordnung vorliegen, die aber noch 19 Schutzgruppen enthält. In Vorversuchen wurde gefunden, dass X auf beiden Reaktionswegen in praktisch gleicher Ausbeute erhalten werden kann⁵⁾. Weil die Reaktionsfolge A einfacher durchzuführen ist (vgl. exper. Teil), haben wir sie für präparative Zwecke vorgezogen.

Die von *t*-Butylalkohol abgeleiteten Schutzgruppen des geschützten grossen H-Peptids VII wurden mittels 95proz. Trifluoressigsäure abgespalten. Das freie Peptid VIII neigte stark zu Fibrillenbildung, weshalb es ohne Reinigung direkt der Jodoxydation unterworfen wurde. Um die besten Bedingungen für den nach dem *Ruggli-Zieglerschen* Verdünnungsprinzip durchgeführten Ringschluss zu finden, wurde die im exper. Teil beschriebene Mikromethode entwickelt, mit welcher gegen 100 Versuche mit je 0,7 mg VIII durchgeführt wurden. Dabei ergab sich als Optimum eine maximale Peptidkonzentration von $2-3 \cdot 10^{-4} \text{M}$; bei höheren Konzentrationen wurden neben Insulin merkliche Mengen von Polymeren gebildet. Als Lösungsmittel verwendete man 60proz. wässrige Essigsäure, doch kann das Essigsäure/Wasser-Verhältnis in weiten Grenzen verändert werden. Bei einem 100fachen molaren Überschuss von Jod war die Bildung der Disulfidbindung bei Raumtemperatur in 5–10 Minuten beendet. Bei nur 10fachem Überschuss benötigte sie 3 Stunden, doch wurden dabei bereits Nebenprodukte gebildet, die besonders in der Elektrophorese sichtbar waren (Desamidoderivate?).

Gegenstromverteilung des rohen Oxydationsgemisches gab reines Humaninsulin (X) in einer Ausbeute von ca. 50%. Daneben wurde in einer Ausbeute von ca. 25% reines [D-Tyrosin B16]-Humaninsulin isoliert. Zur Berechnung der Ausbeute der Jodoxydation muss auch das [D-Tyrosin B16]-Isomere einbezogen werden, da auch in diesem die Disulfidbrücke A7–B7 in korrekter Anordnung gebildet worden ist. Die Cyclisierungsausbeute betrug somit über 70%. Falls es in den gegenwärtig in Bearbeitung stehenden Versuchen gelingt, die Racemisierung des Tyrosinrests B16 zu unterdrücken, wird sich die Ausbeute an Insulin entsprechend erhöhen.

Über die Charakterisierung von synthetischem X und dessen Identifikation mit dem durch Extraktion gewonnenen menschlichen Insulin haben wir bereits früher berichtet [1]. Der empfindliche Vergleich nach enzymatischer Fragmentierung (Fingerprint-Methodik) wurde inzwischen auch noch mit Hilfe von Pepsin und Thermolysin ausgeführt. Die biologische Auswertung in verschiedenen Testsystemen soll demnächst veröffentlicht werden [15].

Das zinkfreie synthetische X wurde in Anlehnung an das übliche Verfahren [16] quantitativ in Form des Zn-Komplexes kristallisiert. Wir ersetzten jedoch das Aceton des Kristallisationspuffers durch *t*-Butylalkohol, um die Möglichkeit einer Bildung

⁵⁾ Interessanterweise erforderte die Schutzgruppenabspaltung an der Insulinvorstufe IX mittels 95proz. Trifluoressigsäure eine merklich längere Reaktionsdauer als diejenige an VII.

von 2,2-Dimethyl-4-imidazolidinon-Derivaten [17] [18] an den *N*-terminalen Kettenenden von Insulin auszuschliessen.

4. Isolierung von natürlichem Humaninsulin. – Menschliche Bauchspeicheldrüsen wurden nach *Romans* [19] extrahiert und das Rohinsulin 3mal an Sephadex G-50 [20] chromatographiert. Die vereinigten Insulin-haltigen Fraktionen wurden mittels Isoelektrofokussierung [21], pH-Gradient 3,5 bis 10, und schliesslich mittels multiplikativer Verteilung gereinigt. Die Extraktions- und Reinigungsoperationen wurden anfänglich radioimmunologisch, dann dünnschichtchromatographisch verfolgt. Aus 8 kg Pankreasgewebe erhielt man 30 mg reines, extraktives Humaninsulin.

5. Diskussion. – Das Hauptmerkmal der vorliegenden Insulinsynthese besteht darin, dass die drei Disulfidbrücken auf verschiedenen Stufen des fragmentweisen Aufbaues gebildet werden. Die dazu benötigten Schutzgruppen und selektiven Reaktionen hatten wir bereits früher anhand einfacherer Modelle untersucht. Ihre kombinierte Anwendung hat sich ebenfalls bei der Synthese von Insulin bewährt.

Bei der Synthese der unsymmetrischen, zweikettigen Cystinderivate und während der Oxydationen mit Jod liessen sich keine Disulfid-Austauschreaktionen nachweisen, die die korrekte Struktur der Zwischen- und Endprodukte in Frage stellen würden. Als unerwartete Schwierigkeit trat einzig die beträchtliche Racemisierung von Tyrosin B16 während der vorletzten Fragmentkondensation auf.

Der Umstand, dass alle das Fragment III enthaltenden Zwischenprodukte mehr oder weniger stark zur Assoziierung neigten, wirkte sich erschwerend auf Analytik und Reinigung aus. Die Assoziierung äusserte sich z.B. in der Ausbildung von hochviskosen, doppelbrechenden Lösungen, bei deren Untersuchung im Elektronenmikroskop Fibrillen sichtbar waren. Diese Erscheinung ist beim Insulin selbst schon seit langem bekannt [22], doch tritt sie dort viel weniger ausgeprägt in Erscheinung als bei einigen Zwischenprodukten unserer Synthese. Dementsprechend liess sich das Endprodukt X besser analysieren und reinigen als die Zwischenprodukte der letzten Stufen.

Von besonderem Interesse ist die Leichtigkeit, mit der in der Endstufe die Disulfidbrücke A7–B7 geschlossen wurde. Kürzlich haben mehrere Arbeitsgruppen, einer Anregung von *Lindsay* [23] folgend, Verfahren ausgearbeitet, in denen die Insulinketten-Rekombination durch künstliche Kettenvernetzung wesentlich verbessert wurde. [24–27]. Die hohen Ausbeuten bei diesen Verfahren beruhen darauf, dass die Kettenderivate in der Rekombinationslösung eine Insulin-ähnliche [28], vorgebildete Raumstruktur aufweisen. In unserem Falle dagegen dürfte das Gelingen der Ringschlussreaktion A7–B7 nicht von einer vorgebildeten, Insulin-ähnlichen Raumstruktur abhängen. Für diese Annahme sprechen folgende Befunde: 1) Wie oben erwähnt, kann diese Disulfidbindung sowohl beim freien grossen H-Peptid VIII wie auch bei seiner geschützten Form VII in praktisch gleicher Ausbeute geschlossen werden. Das stark lipophile, mit 19 *t*-Butylgruppen geschützte VII kann in Lösung kaum die Raumstruktur des Insulins annehmen. 2) Das freie, grosse H-Peptid VIII weist in wässriger Lösung eine viel stärkere Tendenz zur Aggregation auf als Insulin

(X), was auf unterschiedliche Konformationen hinweist. 3) Wir haben inzwischen festgestellt, dass sich die Ringschlussreaktion auch bei der Synthese von Insulin-Analogen anwenden lässt, bei denen aufgrund der Abwandlungen ihrer Primärstruktur die Ausbildung einer Insulin-Raumstruktur ausgeschlossen werden kann.

Über diese Arbeiten soll in Kürze berichtet werden.

Experimenteller Teil

Allgemeines. Dünnschichtchromatogramme (DC): Geschützte Peptide wurden auf Kieselgel (Fertigplatten SL 254 von *Antec*, Birsfelden) chromatographiert, Anfärbung mit TDM-Reagens nach [29]. Für freie Peptide wurden Celluloseplatten (Avice) Fertigplatten von *Schleicher & Schüll*) verwendet, Anfärbung mit TDM oder Säureviolett 6B. Zur Abspaltung der Schutzgruppen wurde 30 Min. in 95proz. TFA stehen gelassen, i. HV. über KOH getrocknet und in Wasser gelöst. Folgende Fließmittel fanden Verwendung (Volumenteile): System 3: Essigester/Pyridin/Wasser 13:4:3; System 43A: *t*-Pentylalkohol/2-Propanol/Wasser 67:26:7; System 43C: *t*-Pentylalkohol/2-Propanol/Wasser 51:21:28; System 45: 2-Butanol/3proz. wäss. NH₃ 7:3; System 52: 1-Butanol/Eisessig/Wasser 75:7:21; System 52A: 1-Butanol/Eisessig/Wasser 67:10:23; System 100: Essigester/Pyridin/Eisessig/Wasser 62:21:6:11; System 101: 1-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 38:24:8:30; System 101A: 1-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 42:24:4:30; System 107: Essigester/Pyridin/Wasser 49:24:27; System 111B: 1-Butanol/Pyridin/konz. NH₃/Wasser 40:24:6:30; System 112A: 1-Butanol/Pyridin/Ameisensäure/Wasser 42:24:4:20; System 112E: 1-Butanol/Pyridin/Ameisensäure/Wasser 44:24:2:20; System 155: Pentylalkohol/Pyridin/Wasser/Methyläthylketon/Ameisensäure 40:28:15:11:5.

Elektrophoresen (EP.) auf Celluloseacetatfolien (Cellogel, 8 × 17 cm, von *Chemetron*, Mailand) wurden bei pH 1,9 (1,67M HOAc + 0,7M HCOOH) und 8,6 (Veronalpuffer, enthaltend 0,28% EDTA + 25% Harnstoff) während 90–120 Min. und 20 V/cm ausgeführt, Anfärbung mit modifiziertem *Barton*-Reagens nach [28].

Sämtliche Zwischenprodukte wurden in geschützter Form im DC. auf Kieselgel und nach Freisetzung mittels TFA im DC. auf Cellulose und mittels EP. analysiert. Bei der EP. auf Celluloseacetatfolien ist neben der Ladung auch die Polarität massgebend, indem lipophile Peptide langsamer wandern als hydrophile. Die DC. freier Peptide auf Cellulose zeigten im allgemeinen ein höheres Auflösungsvermögen als diejenigen der geschützten Derivate auf Kieselgel und sind daher für die Abtrennung nahe verwandter Nebenprodukte besser geeignet. Die besten Chromatographiesysteme sind jeweils bei den Synthesen der Zwischenprodukte aufgeführt, wegen der starken Variabilität des chromatographischen Verhaltens aber ohne Angabe von Rf-Werten. Dagegen sind einige Daten, die den Vergleich der Zwischen- und Endprodukte als *freie* Peptide erlauben, in Tabelle 2 zusammengefasst. Betreffend Charakterisierung des synthetischen X und Vergleich mit natürlichem Humaninsulin vgl. [1].

Teilweise deblockiertes, kleines H-Peptid II. 4,17 g (1,1 mmol) Mono-hydrochlorid des vollgeschützten, kleinen H-Peptids I [2] wurden in 208 ml 90proz. TFEt gelöst («pH» = 5,9) und durch Zugabe von 0,15N wässriger HCl am pH-Stat (*Metrohm*) der «pH» auf 3,5 gesenkt. Der anfänglich rasche Säureverbrauch kam im Laufe von 5 Min., nach Aufnahme von 1,08 mmol HCl, praktisch zum Stillstand. Jetzt wurde durch Zugabe von 0,8 ml Pyridin auf «pH» ca. 5,5 gebracht, i. V. auf ca. 20 ml konzentriert, eingefroren und lyophilisiert. Der Trockenrückstand (4,24 g) wurde zur Extraktion des Triphenylmethanols 2 x mit je 60 ml Äther zerrieben und abgenutscht. Man erhielt 3,82 g Dihydrochlorid von II als amorphes Pulver. Potentiometrische Titration in 90proz. Methanol mit AgNO₃ ergab einen Chloridgehalt von 2,02 Äqu. DC. des geschützten Peptids auf Kieselgel mit den Systemen 3, 43C, 45, 52, 100 und 107, und des freien Peptids auf Cellulose mit den Systemen 45, 101, 112A und 155. Im DC. waren Spuren von Ausgangsprodukt und der Des-Bpoc-Verbindung sichtbar. Durch Vergleich mit bekannten Mengen dieser Substanzen (letztere durch Erwärmen von II in 90proz. TFEt während 2 Std. auf 60° erhalten) wurden beide auf ca. 2% geschätzt.

Teilweise deblockiertes, mittleres H-Peptid V. 9,75 g (2,72 mmol) Dihydrochlorid von II und 7,68 g (3,54 mmol) III [30] wurden in trockenem Zustand vermischt, fein zerrieben und dann in 73 ml DMF (frisch gereinigt durch Filtration über saures Al_2O_3) bei 25° gelöst. Nach Zugabe von 3,33 g $\text{HOBt} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (21,8 mmol) kühlte man auf 0°, fügte 2,24 g (10,9 mmol) DCCI zu und liess die klare Lösung 24 Std. bei 0° und 15 Std. bei 25° stehen. Zuletzt wurden 1,36 ml (10,9 mmol) 3-Dimethylamino-1-propylamin zugefügt und nach 1 Std. das Rohprodukt durch Eintropfen in das 20-fache Volumen Äther ausgefällt. Es wurde abgenutscht, der Niederschlag mit 5proz. NaHCO_3 -Lösung, 1 N Essigsäure und Wasser gewaschen und i. HV. bei 45° getrocknet. Zur gleichzeitigen Bpoc-Abspaltung und Rückwandlung der *N*(Im)-Amidino-histidinderivate wurde die Substanz (17,5 g) in 900 ml 90proz. TFEt gelöst und 2 Std. auf 60° erwärmt, die Lösung auf ca. 50 ml eingengt und lyophilisiert. Der Rückstand wurde 2x mit je 200 ml Äther extrahiert, getrocknet und das Rohprodukt (16,7 g) im System Methanol/1 N HOAc/Äthylchlorid/Chloroform 10:3:8:4 mit Phasenvolumina von je 100 ml multiplikativ verteilt. Nach 1200 Stufen wurden aus den Verteilungselementen Nr. 833–882 durch Einengen auf ein kleines Volumen und Lyophilisieren 4,9 g V (Fraktion A) isoliert. Dieses Material enthielt ca. 30% des nicht abgetrennten [D-Tyrosin B16]-Derivates und Spuren eines weiteren, lipophilen Nebenproduktes. Die Elemente Nr. 793–832 ergaben weitere 6,2 g V (Fraktion B) mit ca. 20% des unbekanntes, lipophilen Nebenproduktes. Zur Abtrennung von Essigsäure wurden die 4,9 g Fraktion A in 30 ml TFEt gelöst und bei 0° zu 300 ml einer 5proz. wässrigen NaHCO_3 -Lösung zugetropft. Es wurde 15 Min. bei 0° gerührt, abfiltriert, der Niederschlag getrocknet und diese Behandlung wiederholt. Das Produkt (4,4 g) war jetzt frei von Essigsäure (GC-Bestimmung) und Chloriden (Titration mit AgNO_3). DC. des geschützten Peptids auf Kieselgel mit den Systemen 3, 45, 52A und 100, und des freien Peptids auf Cellulose mit den Systemen 45, 101, 112A und 155.

Geschütztes, grosses H-Peptid VII. 1,87 g (0,34 mmol) Hydrogencarbonat von V, 0,82 g (0,46 mmol) VI [7] und 0,42 g (2,73 mmol) $\text{HOBt} \cdot \text{H}_2\text{O}$ wurden in trockenem Zustand vermischt und fein zerrieben. Nach Zugabe von 6,5 ml DMF wurde bei 25° gerührt, bis sich eine klare, hochviskose Lösung bildete. Man kühlte auf 0°, gab eine Lösung von 0,28 g (1,37 mmol) DCCI in 2,5 ml DMF zu und liess bei 0° stehen. Gemäss DC. war bereits nach 15 Std. praktisch kein V mehr vorhanden. Nach 18 Std. bei 0° und 5 Std. bei 25° wurde mit 10 ml DMF verdünnt und bei 0° unter starkem Rühren in 200 ml 5proz. NaHCO_3 -Lösung eingetropft. Die feinflockige Fällung wurde abfiltriert, mit Wasser und Äther gewaschen und getrocknet. Zur Rückwandlung der *N*(Im)-Amidino-histidinderivate wurde in 140 ml TFEt und 7 ml Eisessig gelöst, 45 Min. auf 50° erwärmt, auf ein kleines Volumen eingengt und nach Zugabe von Eisessig lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 30 ml Eisessig gelöst und durch Eintropfen in 300 ml Äther gefällt. 2,8 g des erhaltenen amorphen Pulvers wurden im System Methanol/Wasser/Eisessig/Äthylchlorid/Chloroform 45:12:3:55:15 mit Phasenvolumina von je 10 ml verteilt; nach 1000 Stufen liessen sich aus den Elementen Nr. 536–585 durch Einengen unter Zugabe von Eisessig und Lyophilisieren 1,74 g VII als Acetat isolieren. DC. des geschützten Peptids auf Kieselgel mit den Systemen 3, 45, 52A und 100, und des freien Peptids auf Cellulose mit den Systemen 101, 112A, 155.

Überführung von VII in X, Weg A. 293 mg VII (40 μmol , ber. als Triacetat) wurden mit 15 ml 95proz. Trifluoressigsäure (50fache Menge) 1 Std. bei 30° belassen und dann unter Kühlung mit 8 ml Wasser versetzt. Diese Lösung wurde innert 8–9 Min. unter Rühren bei RT. zu der Lösung von 345 mg Jod (1,36 mmol) in 80 ml Eisessig, 27 ml Wasser und 240 μl 1 N HCl getropft. Nachgewaschen wurde 2x mit 2 ml Eisessig. Nach weiteren 8 Min. wurde mit 1,6 ml 1 M Ascorbinsäure und 6 ml 0,5 M Natriumacetat versetzt, wodurch rasch Entfärbung eintrat. Die Lösung wurde an Sephadex G 25 (medium) in 50proz. Essigsäure entsalzt (Säule 4×70 cm). Die peptidhaltige Fraktion wurde bei 30° stark eingengt und der Rest lyophilisiert. Das erhaltene Material (257 mg) wurde im System 1-Butanol/Pyridin/0,1% Essigsäure 5:3:11 [31] über 1200 Stufen verteilt. Nach 600 Verteilungsschritten wurde ein Nebenprodukt mit $K=1,25$ abgetrennt (55 mg; 24%), welches als das [D-Tyrosin B16]-Stereoisomere von X identifiziert wurde (siehe unten). Die Insulin-haltige Fraktion ($K=0,84$) wurde stark eingengt und aus verdünnter Essigsäure lyophilisiert. Da dieses Material (127 mg) noch mit lipophilen Nebenprodukten (ca. 10%) verunreinigt war, wurde es weitergereinigt: 707 mg (aus mehreren Verteilungsansätzen im ersten System vereinigte Fraktionen) wurden im System *t*-Butylalkohol/1 M Ammoniumacetat/ CHCl_3 10:10:0,5 mit Phasenvolumina von je 3 ml über 1400 Stufen verteilt ($K=0,36$). Es wurde zuletzt unter Zusatz von *t*-Butylalkohol und Eisessig

zu einem Sirup eingengt, das Ammoniumacetat auskristallisiert und bei 40° i.HV. wegsublimiert, der Rückstand in 0,5N Essigsäure gelöst und lyophilisiert. Man erhielt so 629 mg (49%) reines, synthetisches Humaninsulin (X) als amorphes Pulver.

Überführung von VII in X, Weg B. 293 mg VII (40 μ mol, gleiche Qualität wie oben), gelöst in 18 ml Eisessig und 5 ml Wasser, wurden unter starkem Rühren in 9 Min. zu einer Lösung von 510 mg Jod (2 mmol) in 120 ml Eisessig, 55 ml Wasser und 240 μ l 1N HCl getropft. Es wurde 2 x mit 2 ml Eisessig nachgewaschen und noch 8 Min. reagieren gelassen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 ml 0,5M Ascorbinsäure gestoppt, mit 4,3 ml 1M Natriumacetat versetzt und sofort an Sephadex G 25 (medium) entsalzt (Säule 4 x 80 cm, in 50proz. Essigsäure). Die Insulin-haltige Fraktion wurde eingengt und lyophilisiert (288 mg). Dieses Material wurde 2 Std. mit 15 ml 95proz. Trifluoressigsäure bei 30° behandelt, eingengt und durch Eintropfen in Äther gefällt. Das erhaltene Trifluoressigsäure (268 mg) wurde in 7 ml 0,05N Essigsäure gelöst, durch Amberlite IR45 in der Acetatform filtriert und das Acetat durch Lyophilisieren isoliert (240 mg). Das Produkt wurde wie oben im 1. Verteilungssystem gereinigt. Vom Nebenprodukt mit $K=1,25$ wurden nach 600 Stufen 47 mg=20% abgetrennt, von X (ebenfalls noch schwach verunreinigt) wurden nach 1000 Stufen 121 mg erhalten.

Mikromethode zur Abklärung der besten Bedingungen für die Überführung von VIII in X. 0,65 ml einer Lösung des grossen, freien H-Peptids in 50proz. Essigsäure, welche nach UV.-Spektrum⁶⁾ 0,12 μ mol (ca. 0,7 mg) Peptid enthielt, wurde unter Rühren zu 0,24 ml 0,1M Jod in Eisessig, 0,31 ml 50proz. Essigsäure und 15 μ l 1N HCl getropft, 10 Min. bei RT. belassen, darauf mit 1M Ascorbinsäure entfärbt und an Sephadex G 25 (medium) entsalzt (Säule 45 ml). Die Insulin-haltige Fraktion wurde isoliert, der Peptidgehalt durch UV.-Messung und der Reinheitsgrad des Insulins mittels halbquantitativer DC. bestimmt. Mit dieser Methode wurde der Einfluss der wichtigsten Faktoren, wie Konzentration des Edukts, Jodmenge, Reaktionsdauer, Essigsäure/Wasser-Verhältnis und Säurestärke, ermittelt.

[D-Tyrosin B16]-Humaninsulin. Dieses Stereoisomere unterschied sich vom Humaninsulin X durch sein merklich lipophileres Verhalten: Durch Verteilung liess es sich leicht von X abtrennen (s. oben), und im DC. wies es höhere Rf-Werte, bei EP. auf Celluloseacetat kleinere Laufstrecken als X auf (s. Tabelle 2). Nach Totalhydrolyse wurden korrekte Aminosäureverhältnisse gefunden. Nach Abbau mit L-Aminosäure-Oxydase aus Schlangengift gemäss [2] blieben 27% D-Tyrosin übrig, entsprechend 1 von insgesamt 4 Tyrosinresten, zuzüglich spurenweiser Racemisierung während der Totalhydrolyse. Das [D-Tyrosin B16]-Humaninsulin konnte als Zinkkomplex nicht kristallisiert werden. Über die biologischen Eigenschaften wird an anderer Stelle berichtet werden.

Tabelle 2. Vergleich verschiedener freier Peptide

	DC. System 112E ^{a)}	System 155 ^{a)}	EP. pH 1,9 ^{b)}	pH 8,6 ^{b)}
Sequenz B(1-16)	0,72	0,52	- 5,8	+ 4,7
Kleines H-Peptid	0,32	0,16	- 6,0	+ 4,0
Mittleres H-Peptid	0,30	0,20	- 5,1	+ 3,7
Grosses H-Peptid	0,34	0,24	- 3,2	+ 4,0
Humaninsulin (X)	0,23	0,12	- 5,3	+ 5,4
[D-Tyrosin-B16]-Humaninsulin	0,26	0,14	- 4,5	+ 4,1

^{a)} Rf-Werte bei DC. auf Cellulose.

^{b)} Laufstrecken in cm bei EP. auf Celluloseacetatfolien bei pH 1,9 (90 Min.) bzw. 8,6 (120 Min.) und 20 V/cm.

⁶⁾ Mit Schweine-Insulin wurde in 50proz. Essigsäure ein ϵ -Wert von $5,8 \cdot 10^3$ ermittelt (λ_{\max} 277 nm).

Für die wertvolle technische Mitarbeit danken wir Frau *V. von Arx*, Frau *I. Zimmermann*, Herrn *W. Beck* und Herrn *H. R. Keller*. Die analytischen Arbeiten wurden in verdankenswerter Weise in unserem Chromatographielaboratorium (Leiter Herr *E. von Arx*) durch Frau *I. Deyber*, Fr. *A. Grosshans*, Frau *I. Hohler*, Herrn *M. Faupel* und Herrn *W. Morgenthaler* ausgeführt.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *P. Sieber, B. Kamber, A. Hartmann, A. Jöhl, B. Riniker & W. Rittel*, *Helv.* 57, 2617 (1974).
 - [2] *B. Kamber, B. Riniker, P. Sieber & W. Rittel*, *Helv.* 59, 2830 (1976).
 - [3] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochim. biophysic. Acta* 121, 1 (1966).
 - [4] *D. F. Veber, J. D. Milkowski, R. G. Denkwalter & R. Hirschmann*, *Tetrahedron Letters* 1968, 3057.
 - [5] *P. Sieber & B. Iselin*, *Helv.* 51, 622 (1968).
 - [6] *D. S. H. W. Nicol & L. F. Smith*, *Nature* 187, 483 (1960).
 - [7] *P. Sieber, B. Kamber, K. Eisler, A. Hartmann, B. Riniker & W. Rittel*, *Helv.* 59, 1489 (1976).
 - [8] *H. Zahn & G. Schmidt*, *Liebigs Ann. Chem.* 731, 101 (1970).
 - [9] *H. Zahn & G. Schmidt*, *Liebigs Ann. Chem.* 731, 91 (1970).
 - [10] *R. G. Hiskey, A. Wittinghofer, A. N. Goud & R. R. Vunnam*, in: 'Peptides: Chemistry, Structure and Biology', R. Walter and J. Meienhofer (Eds.), Ann Arbor Science Publishers Inc., Ann Arbor 1975, S. 487.
 - [11] *B. Riniker, B. Kamber & P. Sieber*, *Helv.* 58, 1086 (1975).
 - [12] *W. König & R. Geiger*, *Chem. Ber.* 103, 788 (1970).
 - [13] *H. Rink & B. Riniker*, *Helv.* 57, 831 (1974).
 - [14] *B. Kamber*, *Helv.* 54, 927 (1971).
 - [15] *F. Märki & W. Albrecht*, in Vorbereitung.
 - [16] *D. F. Steiner*, *Nature* 243, 528 (1973).
 - [17] *V. J. Hruby, D. Yamashiro & V. du Vigneaud*, *J. Amer. chem. Soc.* 90, 7106 (1968).
 - [18] *F. Cardinaux & M. Brenner*, *Helv.* 56, 339 (1973).
 - [19] *R. G. Romans*, *Rec. Progr. Hormone Res.* 10, 241 (1954).
 - [20] *P. R. Davoren*, *Biochim. biophysic. Acta* 63, 150 (1962).
 - [21] *D. Shapcott & D. O'Brien*, *Diabetes* 19, 831 (1970).
 - [22] *D. F. Waugh*, *J. Amer. chem. Soc.* 68, 247 (1946).
 - [23] *D. G. Lindsay*, *FEBS Letters* 21, 105 (1971).
 - [24] *D. Brandenburg, W. Schermutzki & H. Zahn*, *Z. physiol. Chem.* 354, 1521 (1973).
 - [25] *R. Geiger & R. Obermeier*, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 55, 60 (1973).
 - [26] *W. D. Busse, S. R. Hansen & F. H. Carpenter*, *J. Amer. chem. Soc.* 96, 5949 (1974).
 - [27] *S. M. L. Robinson, I. Beetz, O. Loge, D. G. Lindsay & K. Lübke*, *Tetrahedron Letters* 1973, 985.
 - [28] *T. Blundell, G. Dodson, D. Hodgkin & D. Mercola*, *Adv. Protein Chemistry* 26, 279 (1972).
 - [29] *E. v. Arx, M. Faupel & M. Brugger*, *J. Chromatogr.* 120, 224 (1976).
 - [30] *B. Riniker, B. Kamber, P. Sieber & W. Rittel*, zur Veröffentlichung in *Helv. vorgesch.*
 - [31] *L. C. Craig*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 88, 571 (1960).
-