

Zur Frage der partiellen Acylierung des Insulins.

Von

H. Bretschneider und K. Biemann.

Aus dem Chemischen Institut der Universität Innsbruck.

Mit 1 Abbildung.

(Eingelangt am 5. Febr. 1951. Vorgelegt in der Sitzung am 22. Febr. 1951.)

Im Besitze einer einfachen Methode zur selektiven Acylierung von Hydroxylgruppen von Oxyaminoverbindungen (mit nicht tertiärer Aminogruppe), deren Brauchbarkeit sich nicht nur in der Phenyl-alkanolaminreihe¹, sondern auch an biogenen Oxyaminoverbindungen ganz anderer Typen wie Aneurin, ferner einer Aminosäure und ihres Dipeptides (Tyrosin und Glycyltyrosin)² bewährt hatte, schien es interessant, der Frage der partiellen Acylierung des Insulins näherzutreten. Zweck dieser Zeilen soll es nicht nur sein, unsere Befunde mitzuteilen, sondern auch, da sie nur an sehr kleinen Insulinmengen erhoben werden konnten, zu einer erwünschten Nachprüfung durch andere Anlaß zu geben.

Versuche zur partiellen Acetylierung von proteinartigen Wirkstoffen wurden bereits am Pepsin³, Insulin⁴ und am Tabakmosaikvirus⁵ vorgenommen. Allen Versuchen ist die Anwendung von Keten gemeinsam, von welchem erkannt wurde, daß es zuerst die Aminogruppen erfaßt und erst nach längerer Einwirkungszeit die phenolischen Hydroxylgruppen der Tyrosinreste acetyliert. Zur analytischen Verfolgung dieser stufenweisen Acetylierung benützte Herriot³ die Abnahme des freien Aminostickstoffs nach *van Slyke*, anderseits die Abnahme der freien Tyrosinhydroxyle, bestimmt nach *Folin-Wu*. Von *Stern*⁴ wurde dieselbe Arbeitsmethodik, sowohl die präparative als auch die analytische auf das Insulin übertragen.

¹ H. Bretschneider, Mh. Chem. **76**, 368 (1946).

² H. Bretschneider, Mh. Chem. **81**, 647 (1950).

³ R. M. Herriot, J. gen. Physiol. **19**, 283 (1935).

⁴ K. G. Stern, J. biol. Chemistry **122**, 371 (1938).

⁵ G. Schramm, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **274**, 267 (1942).

Der biochemische bzw. biologische Effekt der stufenweisen Acetylierung von Pepsin, gemessen an der fermentativen Fähigkeit *in vitro* und von Insulin, gemessen an der Blutzuckererniedrigung *in vivo*, ist nach genannten Autoren ein paralleler. Zunehmender Acetylierungsgrad schwächt die Wirksamkeit anscheinend nicht, solange nur Aminogruppen erfaßt werden, während nach Acetylierung der Tyrosinreste ein starker Abfall der Wirksamkeit zu beobachten ist. Es wurde daraus der Schluß gezogen, daß freie Tyrosinreste essentiell für die physiologische Wirksamkeit der beiden genannten Stoffe sind.

Dieser Schluß bezüglich der Bedeutung freier Tyrosinreste erschien im Falle des Insulins einer Überprüfung wert. Versuche am Adrenalin hatten nämlich gezeigt, daß durch die partielle Acetylierung der Phenolhydroxyle zum 3,4-Diacetoxyadrenalin⁶ ein von Adrenalin pharmakologisch nicht unterscheidbarer Körper entstanden war⁷; das heißt, daß der Organismus wahrscheinlich die Fähigkeit besitzt, solche Phenolacetylgruppen rasch abzuspalten; ein gleiches wäre danach von einem acetylierten Insulin zu erwarten, welches ebenfalls parenteral verabfolgt wird. Es scheint somit durchaus möglich, daß bei der prolongierten Keteneinwirkung auf Insulin außer Tyrosinresten noch andere funktionelle Gruppen, welche essentiell sein könnten (z. B. Guanidinreste), mit erfaßt wurden. Daß bei Pepsin eine Wirkungsabnahme gefunden wird, ist bei der *in-vitro*-Prüfung desselben verständlich.

Wir versuchten daher, Insulin (I) in ähnlicher Weise, wie sie zur Darstellung des O-Acetyl-glycyltyrosinhydrochlorids beschrieben, zu acetylieren. Das in HCl-gesättigtem Eisessig suspendierte Insulin wird mit Acetylchlorid reagieren gelassen und darauf der Trockenrest auf schonende Weise hergestellt (II). In ähnlicher Weise wurde ein Insulinpräparat derselben Herkunft mit Eisessig-Chlorwasserstoff allein behandelt (III). Das erste Produkt (II) erwies sich als in Wasser wesentlich schlechter löslich als das zweite (III). Zur Prüfung des Acetylierungsgrades bedienten wir uns der von Herriot³ ausgearbeiteten Methodik, die eine zirka 80%ige Acetylierung der Tyrosinreste anzeigte. Ein Präparat ungefähr desselben Acetylierungsgrades (87%) von K. G. Stern⁴ zeigte nur mehr 0,6 Einheiten pro mg. Die physiologische Prüfung unseres Acetylinsulins (II), für die wir Herrn Professor Schaumann auch an dieser Stelle danken möchten, zeigte im Vergleich mit unbehandeltem Insulin (I) und Chlorwasserstoff-Eisessig behandeltem Insulin (III) praktisch keine Abnahme der Aktivität. Damit erscheint folgendes bewiesen: 1. die partielle Acetylierung der freien Phenolhydroxyle der Tyrosinreste des Insulins beeinflußt dessen hormonale Wirksamkeit *nicht*. 2. Die Methode der

⁶ H. Bretschneider, Mh. Chem. 77, 385 (1947).

⁷ Privatmitgl. von weiland Prof. Dr. R. Rößler, Wien.

Salzacylierung ist erstaunlicherweise auch auf einen in mancher Hinsicht so labilen Eiweißkörper wie Insulin übertragbar*.

Experimenteller Teil.

(K. Biemann.)

Acetylierung von Insulin in salzsäure-gesättigtem Eisessig mit Acetylchlorid.

2mal ausgefrorener Eisessig wurde mit trockenem Chlorwasserstoff gesättigt. In 1,5 ccm davon wurden 20 mg kristallisiertes Insulin (I) suspendiert, das aber nur teilweise in Lösung ging. Auf Zusatz von 0,5 ccm Acetylchlorid trat Trübung ein; das Reaktionsgemisch erwärmte sich praktisch nicht. Nach mehrstündigem Stehen unter Silikagelverschluß wurde das ungelöste, zusammengebackene Insulin nochmals mit einem Glasstab zerrieben, um eine bessere Verteilung zu erzielen.

Nach insgesamt 18stündigem Stehen wurde das Reaktionsgemisch im Vakuumexsikkator über Silikagel entgast und dabei auch das Acetylchlorid abgedampft. Durch die Verdunstungskälte erstarrte der Eisessig und wurde dann zur Schonung des Insulins im Eisverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde 3mal mit absol. Äther verrieben, abgehebert und getrocknet.

Es resultierte ein Pulver, das sich in reinem Wasser und — im Gegensatz zum Ausgangsmaterial — in n/1000 Salzsäure nicht gut löste: (II).

Insulin-Chlorhydrat.

Um die Einwirkung von Eisessig-HCl allein auf Insulin bezüglich Löslichkeit, physiologischer Aktivität und chemischer Reaktionen festzustellen, wurde Insulin gleicher Herkunft⁸ genau so behandelt wie im oben beschriebenen Versuch, mit dem Unterschied, daß kein Acetylchlorid zugesetzt wurde.

Es resultierte ein Produkt (III) gleichen Aussehens, das sich jedoch von (II) wie auch vom Ausgangsmaterial durch die gute Löslichkeit in reinem Wasser unterscheidet.

Prüfung des Acetylierungsgrades mit Folin-Reagens⁹.

Diese Methodik wurde von Herriot⁸ beschrieben und auch von K. G. Stern⁴ zur Prüfung des Acetylierungsgrades der Tyrosingruppen seiner Acetylinsulin-Präparate verwendet.

* *Anmerkung bei der Korrektur.* Erst kürzlich (März 1951) wurde uns durch das Entgegenkommen der NOVO Terapeutisk Laboratorium A/S, Kopenhagen, eine sehr interessante Arbeit von K. Hallas-Møller (NYT Nordisk Forlag, Arnold Busck, Kopenhagen 1945) über die Acylierung von Insulin durch Phenylisocyanat im Original bekannt, die zur Auffindung eines neuen protrahiert wirkenden Insulinderivates führte. Anlässlich der Diskussion anderer Acylierungsreaktionen (S. 178) kommt der Autor bezüglich der Deutung der Kettenversuche von K. G. Stern und A. Whites zu der gleichen Annahme, wie sie von uns oben geäußert wurde: „With a longer reaction (sc. of the Ketene) the phenolic groups are attacked, and prior to this, or perhaps parallel with it, the guanidine groups, the result being inactivation“.

⁸ Insulin, International Standard, 1 mg = 22 I E., National Institute of Medical Research, London, NW 3.

⁹ *Folin-Ciocalteu*, J. biol. Chemistry 73, 627 (1929).

Die Messung nach der sogenannten „pH 8-Methode“ wurde prinzipiell gleich wie von *Herriot* angegeben, ausgeführt. Jedoch wurde einerseits wegen der Schwerlöslichkeit des Insulins bei diesem pH eine Endkonzentration von 6 m Harnstoff hergestellt (was auch *Stern* bereits angibt) und andererseits aus praktischen Gründen die Konzentration der Einzelbestandteile etwas verändert, ohne jedoch an der endgültigen Zusammensetzung der Meßlösung etwas zu ändern. Als Testsubstanz wurde Tyrosin und zum Vergleich das in einer vorhergehenden Arbeit² beschriebene O-Acetyl-tyrosin-hydrochlorid verwendet.

Verwendete Lösungen: Von Tyrosin und Acetyltyrosin kamen Stammlösungen zur Verwendung (B, C), während von den Insulinproben Einwaagen gemacht wurden, die zur Erreichung eines gleichen Endvolumens in der entsprechenden Menge Harnstofflösung (A) gelöst wurden.

A: 60%ige Harnstofflösung.

B: l-Tyrosin: 10,507 mg und 4,7 ccm 0,0124 n HCl ad 100,0 ccm Lösung A (1 ccm = 0,105 mg l-Tyrosin).

C: O-Acetyltyrosin-Hydrochlorid: 6,595 mg ad 50,0 ccm Lösung A (1 ccm = 0,132 mg Acetyltyrosin-HCl = 0,0916 mg Tyrosin).

D: *Folin*-Reagens (1 Teil) mit Wasser (4 Teile) verdünnt.

E: Phosphatpuffer: 60 ccm 0,5 m K_2HPO_4 , 34 ccm n NaOH und 6 ccm Wasser.

Zur kolorimetrischen Bestimmung wurden nun 3,0 ccm B (bzw. 3,0 ccm C oder eine 0,3 mg Tyrosin entsprechende Insulinmenge¹⁰ in 3,0 ccm A) mit 4,5 ccm A, 2,5 ccm D und 2,5 ccm E versetzt und die Farbintensität (bei $\lambda = 460$ und $E = 0,75$) mit dem Leitz-Photometer gemessen. Bei Zimmertemp. veränderte sich der Wert nach 30 Min. nicht mehr und wurde abgelesen. Die Lösungen zeigten einen pH-Wert von 8.

Da die Lösung auch ohne Tyrosin bzw. Insulin eine schwache Blaufärbung zeigte, wurde auch dieser Leerwert und zwei weitere, niedere Tyrosinkonzentrationen gemessen, um den Tyrosingehalt der Probelösungen graphisch ermitteln zu können (Eichkurve Abb. 1 und Tabelle 1).

Tabelle 1. Zusammenstellung der Meßergebnisse (alle Messungen am Photometer nach Leitz mit Filter $\lambda = 460$, Extinktion = 0,75).

Nr.	Einwaage	in mg	Ablesung mm	Tyrosin		
				in mg	in % frei	in % acetyliert
1	l-Tyrosin.....	0,315	4,8			
2	„	0,063	17,9			
3	„	0,0315	22,0			
4	leer	—	27,5			
5	O-Acetyl-tyrosin-HCl ..	0,393 ¹¹	22,4	0,026	9,45 ¹²	90,55 ¹²
6	Insulin:					
	(I)	2,622	5,85	0,289	11,0 ¹² , ¹³	
7	(II)	2,293	19,2	0,051	2,22 ¹²	80 ¹⁴
8	(III).....	2,661	5,7	0,297	11,15 ¹²	

¹⁰ Berechnet unter Annahme eines Tyrosingehaltes des Insulins von 12%.
Vgl. *H. Fraenkel-Conrat*, Ann. Rev. Biochem. **12**, 276 (1943).

¹¹ Ist 0,275 mg Tyrosin äquivalent.

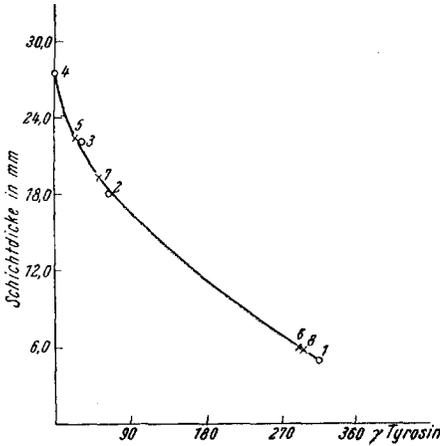


Abb. 1. Eichkurve zur kolorimetrischen Tyrosinbestimmung (vgl. Tab. 1).

Biologische Prüfung (durchgeführt von Prof. Dr. O. Schumann, Pharmakognostisches Institut Innsbruck):

Geprüft wurde das Acetyl-derivat (II), das nur mit Eisessig-Salzsäure behandelte Produkt (III) und zum Vergleich das als Ausgangsmaterial verwendete Insulin (I).

Es wurden Lösungen von (I) und (III) bei pH 4,0, enthaltend 0,192 mg/cem, hergestellt. (II) löste sich auch bei diesem pH nur teilweise, es wurde daher in Suspension injiziert.

Aus Tabelle 2 ist ersichtlich, daß beide Produkte, (II) und (III), praktisch keine Verminderung der hormonalen Wirksamkeit gegenüber (I) zeigen.

Tabelle 2. Blutzuckersenkung am Kaninchen.

Lösungen	mg	cem		mg/cem	pH
		Wasser	n/100 HCl		
(I)	0,911	4,64	0,11	0,192	4,0
(II)	0,986	4,98	0,15	0,192	3,5
(III)	0,917	4,67	0,10	0,192	4,2

Blutzucker: in mg-%.

Stdn.	(I)		(II)		(III)	
	A	B	A	B	A	B
0	108	88,5	112	87	124	92,5
1	80	63,5	93	61	78 ¹⁵	61,5
2	—	61,5	—	67,5	—	63,5
3	107	77	112	65,5	117	52 ¹⁵
4	—	73	—	86,5	—	87

Versuchsreihen: A = 12. 4. 1949; B = 13. 4. 1949.

¹² Bezogen auf Einwaage.

¹³ Sollwert nach H. Fraenkel-Conrat, l. c. 12%.

¹⁴ Bezogen auf im Insulin enthaltenes Tyrosin.

¹⁵ Fällt heraus.