

**SYNTHESE UND PRÜFUNG
AMPHIPHILER INSULIN -
DERIVATE ZUR HERSTELLUNG
EINES "PRODRUGS"**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich

vorgelegt von

ESTHER SCHENKER

eidgen. dipl. Apothekerin
geb. am 25. Januar 1956
von Basel

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. P.P. Speiser, Referent
Prof. Dr. P.L. Luisi, Korreferent

1986

Auch eine Reise von tausend Meilen
fängt mit dem ersten Schritt an.
chinesisches Sprichwort



hr 76

ZUSAMMENFASSUNG

Insulin ist nach Jahrzehnten seiner Erforschung noch immer eine Substanz, die in pharmakotherapeutischer Hinsicht Probleme bietet. Seine Anwendungsart, parenteral, ist nicht immer und überall problemlos möglich. Eine orale Arzneiform wäre für viele Patienten eine erhebliche Erleichterung.

Viele Versuche wurden bereits unternommen Insulin peroral zu verabreichen. Einige der Resultate sind sehr ermutternd, eine perorale Arzneiform steht jedoch noch nicht zur Verfügung. Die an Insulin durchgeführten Modifikationen haben aber alle zur Klärung dessen komplexen Verhaltens bezüglich Konfiguration, Aggregation und Rezeptor Wechselwirkung beigetragen.

Die Modifikation der drei freien Aminogruppen, Glycin A1, Phenylalanin B1 und Lysin B29 wurde sehr oft verwendet und erwies sich auch in dieser Arbeit als äusserst praktikabel. Mit bekannten Mitteln war es möglich ein Fettsäureester, 1,3-Dipalmitin-2-Glycerobernsteinsäure, kovalent an die drei freien Aminogruppen zu binden. Vermutet wurden mehrere Insulin-Derivate im Rohprodukt, das zu untersuchen in der Folge versucht wurde. Definierte Einzelderivate konnten nicht mit Sicherheit identifiziert werden. Mit HPLC konnten drei Derivate abgetrennt werden, deren Unterschiede möglicherweise nur aus der Kettenlänge der Fettsäureester resultieren. Die zur Identifikation durchgeführte HPLC-Prüfung konnte keine entscheidende Klarheit darüber bringen. HPLC-Prüfungen zeigten jedoch, dass es sich bei jedem aufgetrennten Derivat um ein modifiziertes Insulin handelt. Die für das Insulin typischen Aminosäuren konnten alle in der entsprechenden stöchiometrischen Konzentration gefunden werden.

Die physikalischen Prüfungen der Insulin-Derivate zeigten vorwiegend komplexe Phänomene bezüglich Aggregation und Löslichkeit. Eine schlechte Benetzbarkeit der Derivate liess eine erst Vermutung zu, dass der gebildete Partikel von einer Lipidschicht umgeben ist. Das eher hydrophile Insulin scheint von einer Lipidschicht geschützt vorzuliegen. Die Bestimmung des hydrodynamischen Radius (R_h)

des Derivates bestätigt auch eine Aggregation in Partikel mit einem Durchmesser zwischen 60 und 120 nm. Elektronenmikroskop-Aufnahmen lassen eher die Vermutung eines Durchmessers von 10 bis 15 nm für eine sichtbares Primärpartikel zu, welches kettenförmig, sowie frei aggregiert. Die Agglomeration dieser Primärpartikel erklärt die mit Laser-Lichtstreuung gemessenen Durchmesser.

Konformationsstudien bestätigten eine dem Insulin-Monomer ähnliche Tertiärstruktur. Die Veränderung der α -Helix- und β -Faltblatt-Anteile durch die Modifikation sind, soweit die CD-Spektren interpretiert werden können, nicht signifikant und sollten nach Abspalten der Fettsäureester reversibel sein. Die Rezeptorbindung wäre somit ermöglicht und die biologische Aktivität des Insulins würde beibehalten.

Die durchgeführte biologische Überprüfung im Fettzell-assay gibt keinen Aufschluss über die mögliche Rezeptorbindung der Derivate. Das Assay hat aber sehr deutlich den negativen Einfluss der HPLC auf reines Insulin gezeigt. Nach HPLC-Behandlung waren noch 16 % der ursprünglichen biologischen Aktivität von Insulin messbar. Die gemessene Aktivität der Derivate war noch um einiges geringer, doch wäre der Schluss des Verlustes der biologischen Aktivität verfrüht. Es bleibt in-vivo abzuklären, ob das hergestellte Insulin-Derivat als Prodrug wirkt, also erst am Wirkungsort Insulin freisetzt, welches mit dem Rezeptor der Zellmembran in Wechselwirkung treten kann. Mit diesem Versuch bleibt abzuklären, ob die gebildeten Aggregate stabil genug sind das Insulin vor vorzeitigem Abbau zu schützen und bis zum Wirkungsort zu geleiten.

Die Spekulation, Insulin in eine Form zu verwandeln, die das aktive Prinzip einschliesst und erst am Zielorgan wieder freigibt, ist noch offen. Vielleicht ist ein Schritt mehr getan, das Ziel - ein Insulin Prodrug - zu erreichen, um vielen Diabetikern ein einfacheres Mittel mit ihrer Krankheit zu leben in die Hand zu geben.

S U M M A R Y

After years of intensive research, insulin remains in many aspects a problem creating substance. The parenteral application is not in any case that easy. An oral drug delivery system would enhance the comfort of many diabetic patients. Yet many attempts have been undertaken to produce an insulin which could be orally administered. Some of the results are very encouraging, but still there is no oral drug with insulin available. The realized modifications of insulin resulted in giving a clearer picture of the complexity of its configuration, aggregation and receptor-interaction properties.

The modification of the three free aminogroups of glycine A1, phenylalanine B1 and lysine B29 was often used and proved to be very feasible in the present work. Well known biochemical methods were applied to covalently link a 1,3-dipalmitine-hemisuccinate to the three aminogroups. A crude product containing different derivatives resulted.

The crude product was analysed and separated with HPLC into three different derivatives. An endgroup analysis with HPLC should have helped to identify the derivatives as unequally substituted insulins. The obtained results did not show this expected difference. The difference in the HPLC-separation may have occurred from a shortening of chain length of the covalently linked glyceride. To verify this hypothesis more analytical work has to be done.

The amino acid analysis performed also with HPLC showed that all the separated derivatives were modified insulins. The typical amino acids were found in their stoichiometrically predicted ratios in the insulin.

Physical examinations of the insulin derivatives showed intricate phenomena of aggregation and solubility. The poor wettability suggested that the formed particles were surrounded by a lipid-layer. The more hydrophilic insulin therefore would lie buried into a lipophilic particle. The determination of the hydrodynamic radius (R_h) of the derivative confirmed that the aggregated particles were of a diameter between 60 to 120 nm. Pictures made by electron

microscopy allowed to observe particles with diameters of 10 to 15 nm. These primary particles formed chains and aggregates which helps to explain the results obtained measured by laser light scattering.

Conformation studies with circular dichroism confirm a tertiary structure similar to the one of monomer insulin. Changes of the amount of α -helix and β -sheet due to the modifications were not significant and are believed to be reversible after the cutting of the lipid chains. In this case the receptor-binding region would not be affected and could still interact with the receptor to show biological activity.

The biological testing by fat cell assay does not give an answer to a possible receptor interaction. The assay however show clearly a decrease of biological activity of native insulin after separation by HPLC. Only 16 % of the original activity remained. The activity measured for the derivates was even less. But still there is some hope to find biological activity in-vivo. As the insulin derivative is supposed to be a prodrug it has to be tested in this way. This is only possible by in-vivo experimentes to clarify whether the prodrug releases insulin at very the site of interaction.

The speculation to bury insulin within lipids that would protect it from degradation in the intestinal tract and carry it to its final destination remains open. Perhaps a step further towards the aim creating an insulin prodrug is done. And still there is hope to make life with their disease easier for many diabetic patients.